

Tesis doctoral

**Estudio de los Mecanismos Moleculares
Activados por CXCL12 en Células Progeni-
toras Neurales: Implicación de las Distintas
Isoformas de Fosfatidil Inositol 3-Quinasa
de Clase I en Migración**

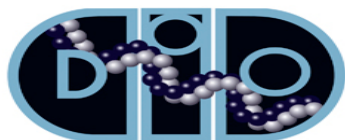
Francisco de Borja López Holgado

Director de Tesis:
Dr. Mario Mellado García

Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid

2012

Esta tesis se ha desarrollado en el Departamento de Inmunología y Oncología (DIO), Centro Nacional de Biotecnología (CNB) y ha sido financiada por una beca FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España.



a Marisa, mi madre

a Patri, mi hermana

Agradecimientos:

Me resulta gracioso mirar al pasado y verme en el último año del instituto eligiendo carrera universitaria. Por aquel entonces era el "boom" de la terapia génica, y eso quería ser yo, ingeniero genético. Mirando las salidas profesionales recuerdo perfectamente el nombre de un instituto bastante nuevo y puntero, de nombre rimbombante, el Centro Nacional de Biotecnología. Y aquí me encuentro, apunto de leer la tesis.

Siempre pensé que ésta sería una de las partes que me resultaría más complicadas de escribir. Supongo que se debe a la sensación de vértigo que produce saber que estás acabando una etapa de tu vida. Ahora que estoy en ello, no veo más que optimismo y las palabras me fluyen solas al darme cuenta de toda la gente que me ha apoyado en este tiempo y a la que estoy enormemente agradecido. Espero no olvidarme de muchos....

Quería comenzar agradeciendo, como no, a Mario Mellado por haberme dado la posibilidad de iniciarme en este mundillo, por haberme transmitido tu pasión por la ciencia y por haber guiado mis pasos en esta andadura desde el comienzo. Por enseñarme a apreciar hasta el último detalle de un experimento y por el optimismo, que nunca pierdes, cuando los resultados no son los esperados. A José Miguel, por tu sinceridad, espontaneidad y tu "otra visión" de las cosas. Por esas escapadas a la montaña o las salidas a correr, aunque nos lleves con la lengua fuera. Los dos contribuís al excelente ambiente de este laboratorio.

No me puedo olvidar de ningún compañero de laboratorio, ya que todos hemos hecho que el día a día en el trabajo sea más ameno. La ayuda que me habéis proporcionado cuando la he necesitado con la misma dedicación como si el problema fuera vuestro, me ha demostrando que somos todos un grupo.

Laurita, por ser una fiera en el trabajo, eficiente, productiva e inteligente.

Pero, encima, te caracteriza tener el corazón más grande que conozco. Siempre sacas tiempo para los demás y me has ayudado muchísimo en todo lo profesional y personal. Ah! Que ganas tengo conocer a Claudia. Vas a ser una madre estupenda!!

Pili, las "manos del laboratorio" siempre dispuesta a descargarnos de trabajo en los momentos de más agobio, teniendo la confianza de que el trabajo saldrá como si lo hiciese uno mismo. Algunas cosas incluso mejor..., además de cuidarnos y mimarnos en el labo como si fuéramos sus niños. A Bea, que empezamos juntos como los niños de labo para acabar siendo doctores a la vez. A Gema por sus buenos consejos, su sentido del humor y su paciencia con mis bromas. A Graciela, por tu afán y ganas que tienes de aprender de todo cuanto te rodea en el labo, no las pierdas nunca. Rubén, creo que todos pensamos que a la hora de la comida te has vuelto insustituible, gracias por todos esos momentos que nos has hecho reír. Y al resto de compañeros y excompañeros de laboratorio: Dimitri, Coloma, Anabel, Sofia, Ricardo, Crispu, Andrea y María Jesús, por hacer tan agradable los días, las comidas, y les deseo que tengan, al menos, tanta suerte como he tenido yo en la finalización de sus trabajos. Por supuesto no me puedo olvidar de las tres Marías del labo que, además de ser unas profesionales, eran la alegría del laboratorio Ana, Silvia y Anabel. Como Anabel dice..."Yo te he criaooo".

A Yolanda Carrasco por haberme enseñado a organizarme en el trabajo, a ser autosuficiente y a mostrarnos que de todos los experimentos siempre se aprende algo, aunque a veces nosotros no lo veamos. Por supuesto a sus niñas, las Carrasco, mis compis de pasillo, por su profesionalidad y buenos consejos en todas esas charlas vespertinas. Aunque odie su tendencia a invadir mi poyata!!

A los doctores Marta Nieto, Manuel Álvarez-Dolado y Ana Clara Carrera, por su imprescindible conocimiento y consejos en campos que desconocíamos, así como por el material de trabajo facilitado.

A los tres clásicos del DIO Antonio Terán de compras, Coral secretaria y Cathy la editora. Como voy a echar de menos tus capones Antonio, mira que eres cascarrabias, pero al final siempre nos consigues lo que necesitamos. Al excelente servicio de citometría y de microscopía del centro. No se que hubiera sido de mí, y de muchos sin la ayuda y eficiencia de Lucio Gómez, gracias por entrenarme en el manejo de animales.

A toda la gente que compone este fantástico departamento que permite hacer ciencia de calidad. Por todos los momentos en que se os ha solicitado ayuda y la habéis prestado sin dudarlo. Además por todos esas

cenas de departamento que han contribuido a que seamos todos una piña, uff!! No hay quien os siga el ritmo. A todos los miembros 413, que tan buena relación tiene con nuestro laboratorio, en especial a Chechu, Vir, Vicen, Abel y Javi.

Del 412 por supuesto mi Lidia, por todas esas conversaciones agradables durante la comida y los buenos consejos. A Cristina, por sus consejos durante la escritura de la tesis.

A Denise, por escucharme en infinidad de ocasiones y por sus "siempre buenos" consejos, su amabilidad y un montón de buenas cualidades.

Lógicamente fuera del ámbito profesional también hay mucha gente a la que debo estar agradecido por sus ánimos e interés durante todo este tiempo.

A mis Estheres y a Leti, que mira que han pasado años desde que nos conocemos y aun seguimos siendo inseparables. Ni siquiera la distancia ha podido con nuestra amistad. Además habéis estado presentes en la escritura de este trabajo desde el principio apoyándome en los momentos de debilidad y... también en los buenos. Artu, que no me olvido de tí!!

A mis compañeros de Universidad, Jero, Miriam M, Alex, Ruth, Esther, Marta y Miriam R, por todos esos momentos inolvidables en la facultad tan presentes siempre.

A Arancha, por su calidad científica y por ser una amiga excelente que ha estado ahí desde que empezamos el doctorado.

A Antonio Manuel, Fotón, por toda su sabiduría, por enseñarme todo lo que se de microscopía, por todas esas largas charlas sobre ciencia que hemos mantenido y sobre todo por demostrar ser un gran amigo que está ahí cuando más se le necesita.

A Patri, solo una cosa "OMG!!" gracias por toda esa alegría que irradas cuando estamos junto a tí.

A toda mi familia por hacerme sentir siempre tan especial e importante, tanto como lo sois vosotros para mi.

Y por supuesto a mi madre, una luchadora modelo, que nos ha transmitido siempre los mejores valores y nos ha dado siempre lo que ha estado en su mano. Todo lo que soy y lo que he conseguido, te lo debo en gran parte a ti.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

<u>ABREVIATURAS</u>	17
<u>ABSTRACT</u>	23
<u>1.- INTRODUCCIÓN</u>	27
1.1.- Neurogénesis y Migración Neuronal Durante el Desarrollo Embrionario	29
1.1.1.- Estructura de la corteza cerebral	29
1.1.2.- Corticogénesis	30
1.1.3.- Modos de migración neuronal	32
1.1.3.1.- Migración radial	32
1.1.3.2.- Migración tangencial	32
1.1.4.- Eventos celulares involucrados en la migración neuronal	33
1.1.5.- Migración y enfermedad	34
1.1.6.- Señales extracelulares implicadas en migración neuronal	35
1.1.6.1.- Factores que regulan la migración radial	35
1.1.6.2.- Factores que regulan la migración tangencial	35
1.1.7.- CXCL12 en el desarrollo de la corteza cerebral	36
1.1.7.1.- Expresión de CXCL12 durante el desarrollo de la corteza cerebral	36
1.1.7.2.- Neuronas de Cajal-Retzius	36
1.1.7.3.- Interneuronas Corticales	36

1.2.- Neurogénesis y Migración Neuronal en el Adulto en Condiciones Fisiopatológicas	38
1.2.1- Neurogénesis en el Adulto	38
1.2.1.1.- Descubrimiento del nicho neurogénico	38
1.2.1.2.- Descripción del nicho neurogénico	38
1.2.1.3.- Migración neuronal en situaciones fisiológicas: Ruta de migración rostral	40
1.2.1.4.-Potenciales funciones de la neurogénesis en el adulto	40
1.2.2.- Migración neuronal en situaciones patológicas	41
1.2.2.1- Isquemia cerebral	41
1.2.2.2- Isquemia e inflamación	42
1.2.2.3- Neurogénesis e isquemia cerebral	43
1.2.2.4- Recuperación y Transplante de NPC	44
1.2.2.5- CXCL12 y migración de NPC en isquemia	44
1.3.- Quimioquinas: Citoquinas Quimioatrayentes	46
1.3.1.- CXCL12 y sus receptores	46
1.3.2.- Señalización por quimioquinas	47
1.3.1.1- Proteínas G heterotriméricas	47
1.3.1.2.- Activación de la ruta Jak/Stat (Janus kinase/ Signal transducer and activator of transcription)	48
1.3.1.3.- Activación de MAPK (mitogen-activated protein kinase)	49
1.3.1.4.- Proteínas lipasas y movilización de Ca ²⁺ intracelular	49
1.3.1.5.- Desensibilización, internalización y reciclaje de GPCR	49
1.4.- Señalización Vía Fosfatidilinositol 3-Quinasa	51
1.4.1.- Clasificación	51
1.4.2.- Regulación de la activación de PI3K	52
1.4.2.1.- Por subunidades reguladoras	52
1.4.2.2.- Por Ras	53
1.4.2.3.- Por GPCR	53
1.4.3.- Funciones de PI3K de clase I	54

1.4.4.- Función de p110 β	54
2.- OBJETIVOS	57
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	61
3.1.- Anticuerpos	63
3.2.- Aislamiento de Progenitores Neuronales y Cultivo de Neuroesferas	64
3.3.- Mantenimiento de cultivos	64
3.4.- Diferenciación de NPC	65
3.5.- Estudios de Migración por Videomicroscopía	65
3.6.- Ensayo de Quimiotaxis	66
3.7.- Estimulación de NPC con CXCL12 y preparación de muestras para Western Blot	67
3.7.1.- Lisados celulares totales	67
3.7.2.- Inmunoprecipitación (IP)	67
3.7.3.- Obtención de extractos nucleares	68
3.7.4.- Separación electroforética y análisis por Western blot	68
3.8.- Citometría de flujo	69
3.8.1.- Marcaje de Proteínas Celulares	69
3.8.2.- Ciclo Celular	69
3.9.- Nucleofección	70
3.10.- Modelo de Isquemia focal por foto-trombosis	70
3.10.1.- Protocolo de inducción de isquemia	70
3.10.2.- Transplante intraparenquimal	71
3.10.3.- Perfusión de animales	72
3.10.4.- Procesamiento del cerebro para análisis histológico	72
3.10.5.- Detección de NPC por citometría de flujo	72
3.11.- Inmunofluorescencia	73
3.11.1.- De células	73
3.11.2.- De tejido	73
3.12.- Cultivo Organotípico de Cerebro de Embrión de Ratón y Electroporación in vitro de la EGM	73

3.13.- Cuantificación y Análisis de Imágenes de Experimentos in vivo	74
3.13.1.- Isquemia	74
3.13.2.- Cortes de embrión	74
3.14.- Técnicas de Biología Molecular	74
3.14.1.- Aislamiento de ARN total	74
3.14.2.- Síntesis de ADN complementario	75
3.14.3.- Q-PCR	76
4.- RESULTADOS	77
4.1.- Aislamiento NPC y Cultivo de Neuroesferas	79
4.1.1.- Aislamiento de NPC	79
4.1.2.- Crecimiento en cultivo de NPC como neuroesferas y su caracterización	80
4.2.- Estudio de la Motilidad de NPC	82
4.2.1.- Elección del medio de migración	82
4.2.2.- Ensayos de migración en tiempo real: Videomicroscopía	84
4.2.3.- Ensayos de migración en cámara de Boyden: Quimiotaxis	88
4.3.- Identificación de Rutas de Señalización Implicadas en la Regulación de la Migración de NPC	91
4.4.- Estudio Bioquímico de la Activación de la Ruta JAK-STAT, PI3K y MAPK en NPC Inducida por CXCL12	93
4.5.- Estudio del Papel de Jak2 en la Migración de NPC en Respuesta a CXCL12	95
4.6.- Estudio del Papel de PI3K en la Migración de NPC en Respuesta a CXCL12	99
4.6.1.- Estudio de las distintas isoformas de p110 en NPC	99
4.6.2.- Estudio de la migración en respuesta a CXCL12 de NPC derivadas de ratones deficientes en p110 δ y en p110 γ	100
4.6.3.- Estudio del papel de p110 α y β en la migración de NPC en respuesta a CXCL12	100
4.6.4.- Silenciamiento de p110 β con shRNA específico de p110 β	102
4.7.- Estudio del Papel de p110 β en Migración de NPC en Modelos de Migración in vivo	104

4.7.1.- Modelo de infarto cerebral focal, por fototrombosis. Estudio de la migración de NPC exógenas al área de la lesión	104
4.7.1.1.- Via intravenosa	107
4.7.1.2.- Via intraparenquimal	111
4.7.2.- Modelo de invasión de la corteza cerebral por interneuronas originadas en la eminencia ganglionar media (EGM)	114
<u>5.- DISCUSIÓN</u>	117
5.1.- Aislamiento y Cultivo de Neuroesferas.	120
5.2.- Estudio de la Motilidad de NPC.	122
5.2.1.- Elección del medio de migración.	123
5.2.2.- Estudio de la Motilidad por Videomicroscopía.	123
5.2.3.- Características Morfológicas de NPC en los Ensayos de Videomicroscopía.	124
5.3.- Mecanismos Moleculares Activados por CXCL12 en NPC.	125
5.3.1.- Activación del receptor: Papel de CXCR4 y CXCR7 en la migración de NPC.	125
5.3.2.- Papel de la Ruta Jak/Stat en la Migración de NPC en Respuesta a CXCL12.	126
5.3.3.- Papel de PI3K en la Migración de NPC en Respuesta a CXCL12.	128
5.4.- Papel de PI3K en la migración de interneuronas durante corticogénesis.	130
5.5.- Estudio de la Motilidad de NPC en un Modelo de Isquemia Cerebral por Fototrombosis.	131
<u>6.- CONCLUSIONES</u>	137
<u>7.- BIBLIOGRAFÍA</u>	141
<u>ANEXO I (Material Audiovisual Suplementario)</u>	167
<u>ANEXO II (Glosario de Términos)</u>	171

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Ab: anticuerpo (del inglés “antibody”)

ADN: ácido desoxiribonucleico

ADNc: ácido desoxiribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNi: ácido ribonucleico interferente

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés “brain-derived neurotrophic factor”)

bHLH: Dominio básico de unión a DNA del tipo hélice giro hélice (del inglés “basic helix loop helix”)

BSA: Albúmina de suero bovino (del inglés “bovine serum albumin”)

AMPC: adenosina monofosfato cíclica

Da: Dalton

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico (del inglés “epidermal growth factor”)

EGM: eminencia ganglionar media

ERK: proteína quinasa regulada por señales extracelulares (del inglés “extracellular signal-regulated kinase”)

- FAK:** quinasa asociada a las adhesiones focales (del inglés “focal adhesion kinase”)
- FBS:** suero de ternera fetal (del inglés “fetal beef serum”)
- FGF:** factor de crecimiento fibroblástico (del inglés “fibroblast growth factor”)
- GAP:** proteína activadora de la actividad GTPasa (del inglés “GTPase activating protein”)
- GDNF:** factor neurotrófico derivado de células gliales (del inglés “glial-derived neurotrophic growth factor”)
- GDP:** guanosina 5'-difosfato
- GEF:** factor intercambiador de nucleótidos de guanina (del inglés “guanine nucleotide exchange factor”)
- GFP:** proteína verde fluorescente (del inglés “green fluorescent protein”)
- GRK:** quinasa de receptores acoplados a proteínas G (del inglés “G-protein receptor kinase”)
- GTP:** guanosina 5'-trifosfato
- GPCR:** Receptor acoplado a proteína G (del inglés “G-protein coupled receptor”)
- HEPES:** ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanolsulfónico
- HGF:** factor de crecimiento hepático (del inglés “hepatocyte growth factor”)
- HPC:** célula progenitora hematopoyética (del inglés “hematopoietic progenitor cell”)
- ICAM-1:** Molécula de adhesión intercelular 1 (del inglés “intercellular adhesion molecule 1”)
- IL:** Interleuquina
- IP₃:** inositol-1, 4, 5- trifosfato
- Jak:** quinasa de la familia JANUS (del inglés “JANUS kinase”)
- mAb:** anticuerpo monoclonal (del inglés “monoclonal antibody”)
- MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés “Mitogen-activated protein kinase”)
- MCAO:** oclusión de la arteria cerebral media (del inglés “middle cerebral artery occlusion”)
- NPC:** célula madre/progenitora neural (del inglés “neural stem/progenitor cell”)
- Nrg1:** neurregulina-1

NSC: célula madre neural (del inglés “neural stem cell”)

NT-4: neurotrofina-4

PAGE-SDS: electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (del inglés “polyacrilamide gel electrophoresis-sodium dodecyl sulfate”)

PC: placa cortical

PBS: tampón fosfato salino (del inglés “phosphate buffered saline”)

PCR Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “Polymerase Chain Reaction”)

PIP₂: fosfatidil inositol- 4, 5-disfosfato

PIP₃: fosfatidil inositol- 3, 4, 5-trisfosfato

PI3K: quinasa de fosfoinositidos 3 (del inglés “Phosphatidylinositol 3-kinases”)

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

PLC: Fosfolipasa C (del inglés “Phospholipase C”)

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés “phenylmethylsulfonyl fluoride”)

Ptx: Toxina pertúsica (del inglés “Pertussis toxin”)

QPCR: PCR cuantitativa (del inglés “quantitative PCR”)

RFP: proteína roja fluorescente (del inglés “red fluorescent protein”)

RGS: proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (del inglés “regulators of G-protein signaling”)

SH2: dominio de homología 2 con Src quinasa (del inglés “Src homology domain 2”)

SH3: dominio de homología 3 con Src quinasa (del inglés “Src homology domain 3”)

SHP: proteína tirosina fosfatasa con dominios SH2 dominio de homología 2 con Src quinasa (del inglés “SH2 containing tyrosine phosphatase”)

shRNA: ARN pequeño horquillado (de inglés “short hairpin RNA”)

Stat: factor activador de la transducción de señales y la transcripción (del inglés “signal transducers and activators of transcription”)

SOCS: supresores de la señalización por citoquinas (del inglés “suppressor of cytokine

signaling”)

TBS: tampón tris- salino (del inglés “tris-buffered saline”)

VCAM: Molécula de adhesión vascular (del inglés, “vascular cell adhesion Molecule”)

VEGF: factor de crecimiento vascular (del inglés “vascular endothelial growth factor”)

Wb: Western blot

Wt: genotipo silvestre (del inglés “wild type”)

ZI: zona intermedia

ZM: zona marginal (del inglés “marginal zone”)

ZSV: zona subventricular

ZV: Zona ventricular

ABSTRACT

ABSTRACT

During central nervous system (CNS) development, neural progenitor cells (NPC) migrate from the neurogenic niches to the site at which they complete differentiation into mature neurons and establish correct connections with other neurons. Some of these migratory routes remain active during adulthood, when NPC migrate from the subventricular zone in the lateral ventricles to the olfactory bulb. Moreover, after brain insult such as ischemic stroke, NPC migrate specifically toward the lesion. These routes are regulated by a balance between chemotactic and chemorepellent molecules. Among other chemokines, CXCL12 regulates migration and localization of several NPC types during development, and its deficiency provokes severe alterations in various CNS structures such as cerebellum, hippocampus and cerebral cortex. During corticogenesis, NPC that arise in the middle ganglionic eminence (MGE) migrate to the cortex, where CXCL12 has an important role in the maintenance of this migratory route. Following ischemia, CXCL12 and other molecules are upregulated in the periinfarct areas, acting as chemoattractants of NPC to the damage area.

Whereas CXCL12 signaling has been studied extensively in leukocytes, there are few reports for NPC. As defective NPC migration induces severe disease in humans, the molecular mechanisms that govern this process require further analysis to better understand these diseases and develop new therapeutic strategies. Using a chemotaxis assay and a murine stroke model, we observed that NPC migrated in response to CXCL12. We studied the molecular mechanism of CXCL12-mediated NPC migration and found activation of the JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) pathway following CXCL12 stimulation. Chemotaxis assays using several JAK-deficient NPC nonetheless showed that at difference from leukocytes, migration of these cells is not dependent on JAK activity.

In other experiments, we observed that PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) family members participated in *in vitro* migration of NPC, which express mainly the class I PI3K catalytic subunits p110 α and β . Although CXCL12 activated p110 α and β in NPC, use of isoform-specific inhibitors, combined with shRNA techniques, showed that only p110 β participated in CXCL12-mediated *in vitro* NPC migration. Using organotypic slice cultures to determine the *in vivo* effect of p110 β blockade on migrating NPC, we found that after treatment with a p110 β -specific inhibitor, NPC did not exit the MGE and thus did not migrate to the cerebral cortex.

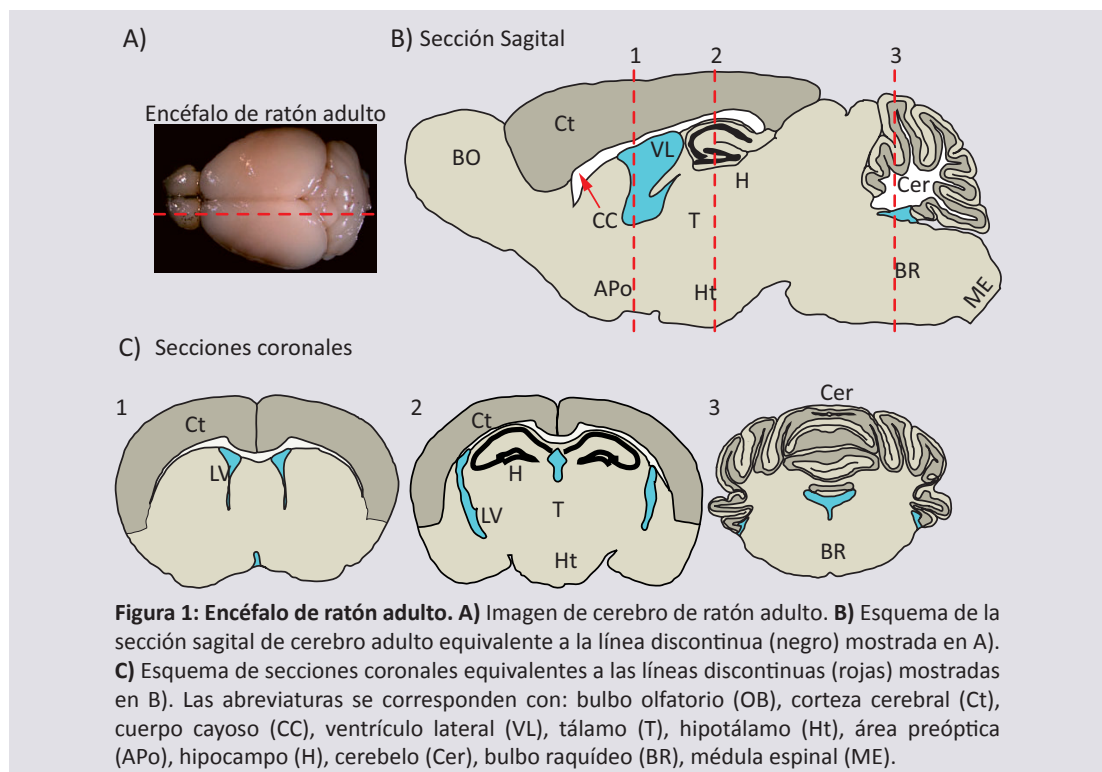
We conclude that PI3K p110 β is activated specifically in NPC in response to CXCL12, and its activity is necessary for the migration of cortical NPC that originate in the MGE during corticogenesis.

INTRODUCCIÓN

1.1.- Neurogénesis y Migración Neuronal Durante el Desarrollo Embrionario.

1.1.1.- Estructura de la corteza cerebral.

La corteza cerebral se encuentra en la parte dorsal del cerebro siendo la estructura más externa que recubre los hemisferios cerebrales. Dentro de la corteza se pueden distinguir tres estructuras filogenéticamente diferentes: neocórtex, paleocórtex (núcleo olfatorio) y arqueocórtex (hipocampo). El neocórtex es la estructura más externa y moderna evolutivamente hablando. Sus funciones están relacionadas con: la percepción sensorial, la generación de las órdenes motoras, la cognición y el lenguaje (en humanos), de ahí que su tamaño se relacione con el desarrollo de la capacidad cognitiva. En el neocórtex, se pueden distinguir seis láminas (nombradas de la I, la más externa, a la VI, la más interna). Las diferentes láminas están compuestas por distintos tipos neuronales, aunque en general, un 80-90% son neuronas excitadoras (también conocidas como piramidales o de proyección) mientras que el resto lo

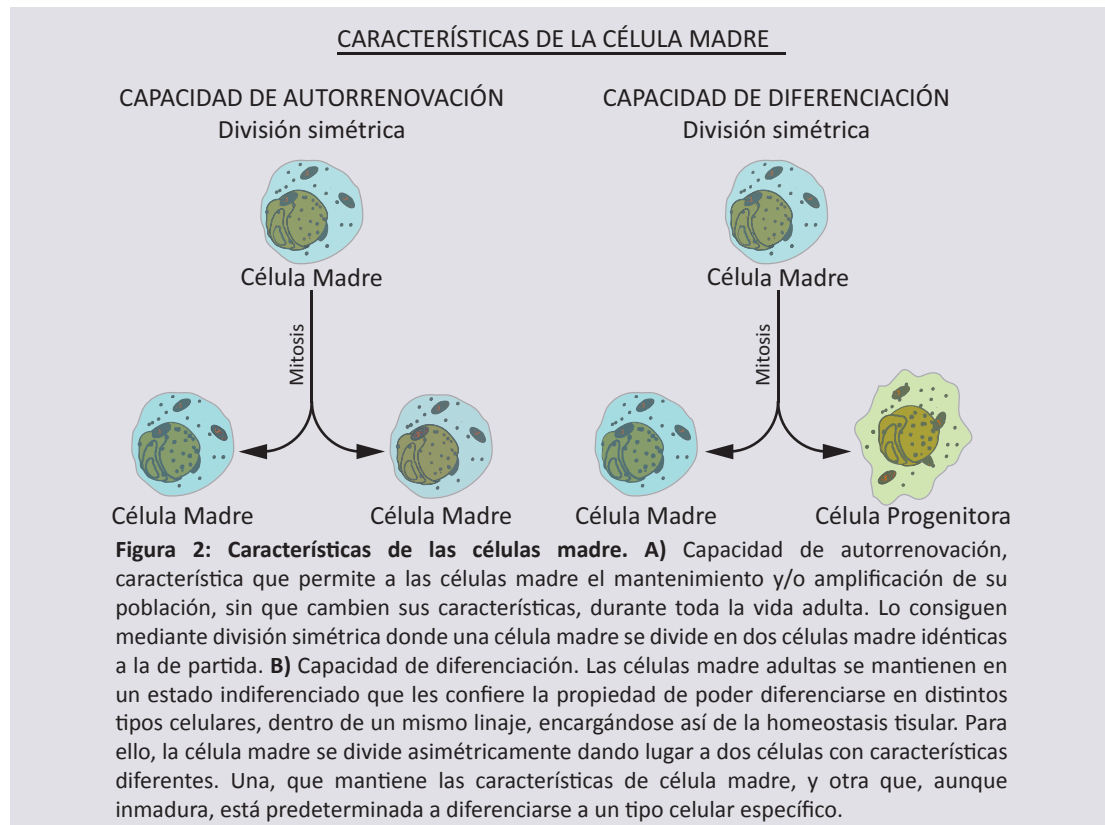


componen neuronas inhibitorias (o **interneuronas**), que regulan la actividad de las primeras.

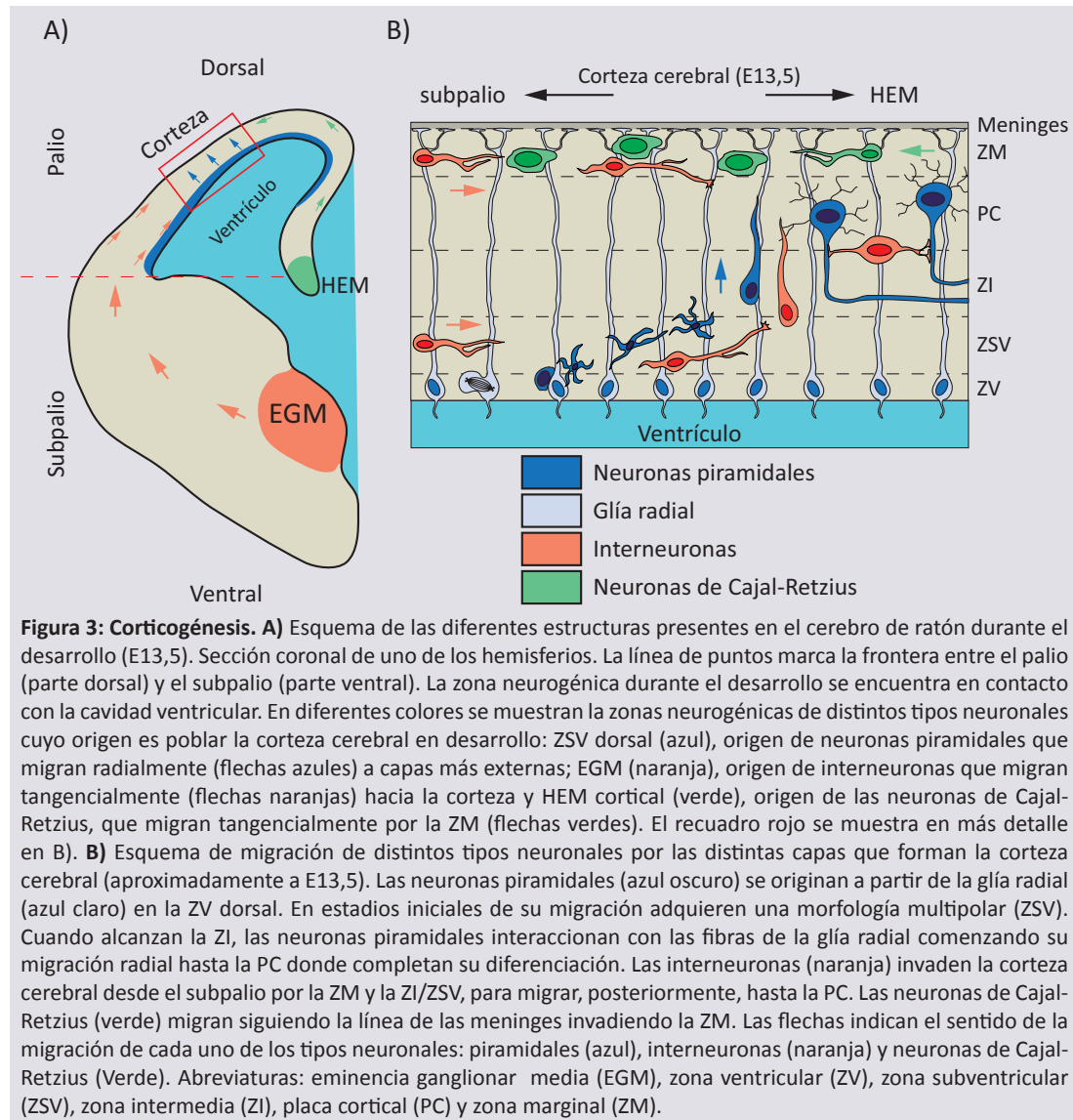
1.1.2.- Corticogénesis.

Durante el desarrollo, la migración de precursores neuronales es crítica para la formación de las distintas estructuras del Sistema Nervioso Central (SNC). En ocasiones, estos precursores deben migrar grandes distancias desde la zona neurogénica donde se originaron, en respuesta a un balance entre gradientes quimioatrayentes y quimiorepelentes en el medio extracelular. Algunas de estas rutas de migración son: la migración tangencial de progenitores de células granulares, desde el labio róbico hasta el cerebelo para formar la capa granular externa (Sotelo, 2004); la migración radial de las células granulares del cerebelo, desde la capa granular externa hasta la capa granular interna (Tiveron and Cremer, 2008) y la migración tangencial de interneuronas, desde la eminencia ganglionar caudal hasta el bulbo olfatorio (Kriegstein and Noctor, 2004; Marin and Rubenstein, 2001).

El origen de la corteza cerebral también depende de la migración neuronal (Fig. 3A). Las neuronas de la corteza cerebral nacen del epitelio pseudoestratificado que rodean los **ventrículos** cerebrales conocido como **zona ventricular** (ZV) (Rakic and Goldman-Rakic, 1982) (Fig. 3). Antes del comienzo de la **neurogénesis**, todas las células progenitoras (NPC del inglés “Neural stem progenitor cells”) se dividen de forma **simétrica** (Fig. 2) para producir dos células hijas con las mismas características que la célula madre inicial. Al comienzo de la neurogénesis, algunas NPC se dividen de forma **asimétrica** (Fig. 2), formándose las primeras neuronas. El porcentaje de células que sufren división asimétrica aumenta durante el desarrollo hasta que al final de la neurogénesis, la mayoría de las NPC se dividen de forma simétrica, dando lugar a dos células hijas determinadas para el linaje neuronal. Esta etapa final, produce



una disminución del número de NPC en la zona neurogénica, aunque una fracción permanecerá activa como NPC durante toda la vida adulta (Caviness and Takahashi, 1995; Merkle and Alvarez-Buylla, 2006).



Aproximadamente a estadio E11 (días de gestación), la primera oleada de neuronas originadas en la **zona subventricular (ZSV)** dorsal migra radialmente hacia la superficie pial y constituir la preplaca. Las neuronas de la preplaca emiten sus axones formando la **zona intermedia (ZI)**. Aproximadamente a E13, se constituye la **zona marginal (ZM)**, subyacente a las meninges, debido a la llegada de las células de Cajal-Retzius, que migran tangencialmente por la superficie pial desde el hem cortical (Bielle et al., 2005; Borrell and Marin, 2006; Takiguchi-Hayashi et al., 2004) (Fig. 3B). La llegada de nuevas neuronas a la placa cortical (PC) hace que ésta vaya engrosando a lo largo del desarrollo. Las nuevas neuronas se posicionan en distintas capas dentro de la PC, lo que viene determinado por la edad de nacimiento de las neuronas. Es un proceso de laminación de dentro a fuera, ya que las neuronas nuevas, atraviesan la capa de neuronas formada previamente, para posicionarse delante de ésta y justo debajo de la ZM (Fig. 3B). Así se forman las láminas de la II a la VI de la corteza cerebral del ratón adulto (Marin and Rubenstein, 2003). Es decir, las primeras neuronas formarán las

capas más profundas de la corteza cerebral. Se sabe que, las señales que especifican para cada capa, así como la competencia de las neuronas generadas para responder a tales señales va modificándose durante el desarrollo (Kriegstein and Noctor, 2004).

Las células que van poblando la PC durante el desarrollo son fundamentalmente neuronas piramidales e **interneuronas**. Ambos tipos neuronales se originan en lugares diferentes y, por tanto, siguen rutas de migración distintas hasta la PC. Las neuronas piramidales siguen una ruta de migración radial desde la ZV dorsal (Fig. 3B). Sin embargo, las interneuronas se originan en la eminencia ganglionar media (EGM), en el **subpalio**, y migran tangencialmente largas distancias hasta la PC (Fig. 3A, B).

1.1.3.- Modos de migración neuronal.

1.1.3.1.- Migración radial: neuronas piramidales.

En la ZV dorsal del **telencéfalo** se encuentra la glía radial, células progenitoras caracterizadas por presentar el soma en la pared de la cavidad ventricular, emitiendo largas proyecciones hacia la superficie pial (Fig. 3B, azul claro). Estas proyecciones se mantienen durante el desarrollo, alargándose según aumenta de grosor la corteza cerebral. La glía radial origina los precursores de neuronas piramidales que migran hacia la superficie pial haciendo uso de las fibras de la glía radial.

La observación microscópica de cultivos organotípicos ha desvelado el comportamiento de las neuronas durante su migración radial. A su paso por la ZSV, las neuronas piramidales sufren abruptos cambios de polaridad y morfología que provocan cambios de dirección y velocidad (LoTurco and Bai, 2006; Marin et al., 2006) (Fig. 3B, azul oscuro). Es posible que en los estadios iniciales las neuronas exploren sus alrededores en busca de señales de guía. Una vez alcanzada la IZ, las neuronas piramidales adquieren morfología bipolar, iniciando su migración hacia la PC en asociación con las fibras de la glía radial (Fig. 3B, azul oscuro).

Se han observado dos modos de migración radial diferentes: migración por translocación del soma y migración por locomoción (Ayala et al., 2007). En el primer modo, la neurona emite una proyección de membrana larga que crece hasta anclarse en la superficie pial, a continuación, se produce el desplazamiento del núcleo. En el segundo modo, las neuronas emiten un frente de avance, relativamente estable durante la migración, de menor longitud y sin ramificaciones. Es frecuente observar que una misma célula cambia de un modo de migración a otro, por ejemplo, las neuronas en locomoción, suelen cambiar a traslocación del soma en las últimas etapas de su migración (Nadarajah et al., 2001).

1.1.3.2.- Migración tangencial.

Se denomina migración tangencial, cuando la dirección del movimiento de los precursores es ortogonal al plano de las fibras de la glía radial. Este tipo de migración es característico de precursores de interneuronas (también conocidas como neuronas

GABAérgicas). Las interneuronas, se originan en las eminencias ganglionares, situadas en el subpalio del cerebro en desarrollo. Se conocen dos rutas tangenciales principales que parten de las eminencias ganglionares. La primera, lo hace desde la EGM hacia la corteza y el hipocampo (Fig. 3A), la segunda, parte de la eminencia ganglionar lateral hasta el bulbo olfatorio. Esta última se mantiene a lo largo de la vida adulta del ratón y se conoce como ruta de migración rostral (Kriegstein and Noctor, 2004; Marin and Rubenstein, 2001).

En estadios muy tempranos del desarrollo, las interneuronas originadas en la EGM migran hacia la corteza invadiendo ésta por la ZM (Fig. 3B, rojo). En la mitad de la gestación, entre E12,5 y E14,5, las interneuronas empiezan a invadir la corteza también por la ZSV y la parte baja de la ZI (Fig. 3B, rojo). Finalmente, estas células cambian a migración radial, lo que les permite invadir la PC y completar allí su diferenciación.

A diferencia de las neuronas piramidales, las interneuronas poseen un frente de avance ramificado (Martini et al., 2009). Estas ramificaciones son dinámicas y se estabilizan o contraen en función de la dirección que siga la célula. Tanto la frecuencia como la orientación en la que se formará la nueva ramificación, depende de las señales extracelulares que se vaya encontrando la célula en su recorrido. Una vez estabilizada la nueva rama, se produce la retracción de la rama antigua para volver a empezar el ciclo. Este modo de migración le permite a la interneurona cambiar de dirección rápidamente sin tener que reorientar las ramas existentes (Martini et al., 2009).

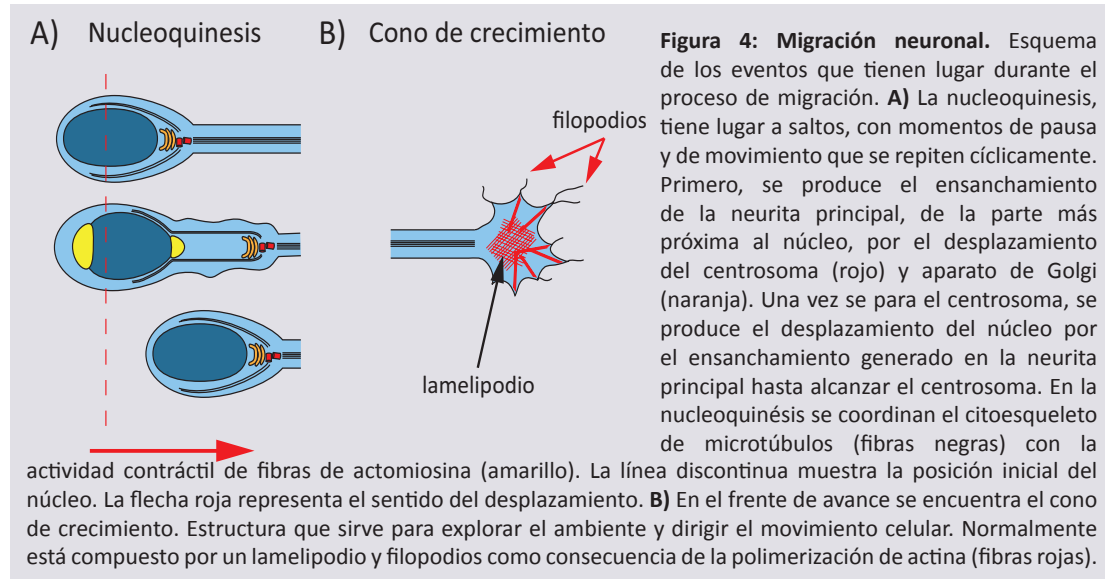
Se ha visto que un número elevado de interneuronas (40%) cuando llegan a la corteza migran hacia la ZSV antes de migrar radialmente hacia la PC (Kriegstein and Noctor, 2004; Nadarajah et al., 2002). Además, las neuronas piramidales e interneuronas que pueblan una misma capa, nacen a la vez en sus correspondientes zonas germinales. Es posible que, de ese modo, las interneuronas se encuentren en la ZSV con las neuronas piramidales, coordinándose la migración radial de ambos tipos neuronales (Ayala et al., 2007).

1.1.4.- Eventos celulares involucrados en la migración neuronal.

De manera general, en ambos modos de migración, la neurona en migración extiende una neurita que va a formar el frente de avance. Éste, cambia de morfología, se contrae y se extiende para explorar el medio, hasta que se estabiliza y se produce el desplazamiento del núcleo, nucleoquinesis, a través de la neurita principal que va seguido de la retracción de la parte trasera.

El cono de crecimiento es una estructura localizada en la parte delantera del frente de avance y está compuesto por filamentos de actina con gran actividad de **filopodios** y **lamelipodio**. Siguiendo al cono de crecimiento, se encuentra un haz de abundantes microtúbulos que estabilizan el frente de avance (Dehmelt and Halpain, 2004) (Fig. 4B).

En la mayoría de los tipos celulares estudiados, la nucleoquinesis tiene lugar en una serie de pasos, que se repiten de manera cíclica. Primero, se produce el ensanchamiento del frente de avance en la parte proximal al núcleo (Fig. 4A, centro), debido al movimiento del centrosoma y el aparato de Golgi. A continuación, se produce el desplazamiento del núcleo hasta llegar a la posición alcanzada por el centrosoma (Fig. 4A, abajo), utilizando para ello el sistema de microtúbulos que lo rodean (Higginbotham and Gleeson, 2007; Tsai and Gleeson, 2005). En el proceso, se coordinan el citoesqueleto de actina y el de microtúbulos, tanto en el desplazamiento del centrosoma por el frente de avance (Tsai et al., 2007) como en la traslación del núcleo y la retracción de la parte trasera (Bellion et al., 2005; Schaar and



McConnell, 2005).

1.1.5.- Migración y enfermedad.

Las malformaciones del desarrollo cortical son un grupo heterogéneo de patologías caracterizadas por una corteza cerebral estructuralmente anormal. Se conocen como displasias corticales y normalmente son consecuencia de mutaciones genéticas, aunque también pueden ser producidas por infecciones prenatales, isquemia o exposición a tóxicos. Las causas pueden deberse a defectos en la proliferación de progenitores y/o en la migración de precursores. Por ejemplo, mutaciones en tubulinas α y β producen, en humanos, lisencefalia (ausencia de circunvoluciones en la corteza), paquigiria (ensanchamiento y aplanamiento de las circunvoluciones) y polimicrogria (excesivas circunvoluciones, con surcos de poca profundidad y una estructura anormal de las capas de la corteza) (Jaglin et al., 2009; Keays et al., 2007).

Mutaciones en la proteína doblecortina (Dcx) producen el síndrome de la doble corteza o heterotopia sucortical en banda, que se caracteriza por la acumulación periventricular de un gran número de neuronas que han fallado en su migración durante el desarrollo (Manent et al., 2009).

Algunas evidencias muestran que la pérdida del balance entre señales de excitación

e inhibición en circuitos específicos del cerebro, como consecuencia de una migración defectuosa, son responsables de los síntomas observados en varios desórdenes psiquiátricos (Di Cristo, 2007) como, por ejemplo, esquizofrenia (Duan et al., 2007; Kamiya et al., 2005), ansiedad o depresión (Riccio et al., 2009).

1.1.6.- Señales extracelulares implicadas en migración neuronal.

La regulación de las rutas de migración de precursores neuronales durante el desarrollo es compleja debido al elevado número de estructuras y al alto grado de organización que presenta el SNC. La migración de precursores desde la zona neurogénica hasta la posición final está regulada por una serie de factores quimioatrayentes y quimiorepelentes que se encuentran en el medio extracelular.

1.1.6.1.- Factores que regulan la migración radial.

Los factores de crecimiento de la familia de las neurotrofinas BDNF (del inglés “brain derived neurotrophic factor”) y NT4 (del inglés “neurotrophin”) se expresan en la PC e inducen la migración de NPC *in vitro* (Behar et al., 1997). Además, la expresión ectópica *in vivo* de estos factores produce, como consecuencia, alteraciones en la estructura laminar de la corteza (Ringstedt et al., 1998). El ratón deficiente en Erb1, que reconoce EGF (del inglés “epidermal growth factor”) y TGF α (del inglés “transforming growth factor”) expresados en la PC (Kornblum et al., 1997; Nakagawa et al., 1998), muestra acumulación de NPC en la ZSV, debido a fallo en la migración radial de **neuronas de proyección** (Threadgill et al., 1995). La proteína Reelin, expresada por las neuronas de Cajal-Retzius en la ZM, es muy importante para la correcta laminación en la corteza cerebral, sobre todo, de las capas más externas (Rice and Curran, 2001; Valiente and Marin, 2010).

1.1.6.2.- Factores que regulan la migración tangencial.

La migración de interneuronas hacia el **palio** está regulada por la actividad quimiorepelente del área preóptica (en la parte más ventral), debido a un factor quimiorepelente aún si identificar, que evita que invadan regiones ventrales para dirigirse hacia la corteza (Marin et al., 2003; Marin and Rubenstein, 2003). Las interneuronas corticales, que expresan los receptores de semaforinas, neuropilina-1 y -2, van a evitar la invasión del **estriado** en su migración dorsal, debido a la expresión de Semaforina 3A y 3F en dicha área (Marin and Rubenstein, 2001).

También se han descrito factores que actúan como estimuladores de la migración y quimioatrayentes en la regulación de la migración tangencial. HGF se expresa en el subpalio y tiene un papel importante en la migración hacia la corteza (Powell et al., 2001). El ratón deficiente en el receptor de neuregulina 1 (Nrg1), ErbB4, muestra defecto en la llegada de interneuronas a la corteza (Flames et al., 2004). Nrg1 se expresa de dos formas en el subpalio: como proteína anclada a la membrana, que establece un corredor por el cual las interneuronas migran hacia la corteza, y en forma soluble, estableciendo un gradiente quimiotáctico que dirige

las interneuronas hacia el **palio** (Flames et al., 2004). Otras de las moléculas que muestran ser potentes quimioatrayentes de interneuronas *in vitro* es CXCL12 (Li et al., 2008; Stumm et al., 2003). Además, los ratones deficientes en CXCL12 muestran defectos en la laminación de interneuronas *in vivo* (Stumm et al., 2003).

1.1.7.- CXCL12 en el desarrollo de la corteza cerebral.

La corteza se forma por la llegada de distintos tipos neuronales y CXCL12 juega un papel muy importante en la regulación y mantenimiento de estas rutas de migración, ya sea de manera directa o indirecta.

1.1.7.1.- Expresión de CXCL12 durante el desarrollo de la corteza cerebral.

Durante el desarrollo de la corteza cerebral en roedores, CXCL12 se expresa principalmente en las meninges y en la ZSV/ZI. En las meninges se expresa muy temprano por los meningocitos que constituyen una fuente de CXCL12 durante todo el desarrollo (Daniel et al., 2005; Tham et al., 2001; Tissir et al., 2004; Tiveron et al., 2006). En la ZSV cortical, CXCL12 lo expresan los progenitores (Tiveron et al., 2006) a partir de E12,5 en el borde palio/**subpalio**, extendiéndose mediodorsalmente hasta alcanzar el hipocampo en formación (Daniel et al., 2005; Stumm et al., 2007; Tiveron et al., 2006).

1.1.7.2.- Neuronas de Cajal-Retzius.

Las células de Cajal-Retzius son un tipo neuronal transitorio que se localiza en la ZM. Estas células juegan un papel crucial en corticogénesis, ya que expresan Reelin, proteína quimioatrayente que regula la migración radial de neuronas piramidales desde la ZSV dorsal (Soriano and Del Rio, 2005).

A estadio E11,5, las células de Cajal-Retzius, que se originan en el hem cortical, colonizan la ZM en una ruta de migración dorso-ventral que sigue la línea de las meninges (Fig. 3A, B, verde). El CXCL12, expresado por las meninges, juega un papel importante tanto en el mantenimiento de esta ruta (Borrell and Marin, 2006) como en restringir la localización de las células de Cajal-Retzius a la ZM, una vez han completado su migración (Paredes et al., 2006).

1.1.7.3.- Interneuronas Corticales.

Las **interneuronas** migran desde la EGM invadiendo la corteza cerebral, primero, por la ZM y después, lo hacen también por la ZSV (Fig. 3A, B, rojo), evitando la entrada en la PC en estadios tempranos. Esta distribución coincide con el patrón de expresión de CXCL12 a nivel de ARNm en la corteza cerebral en desarrollo (Stumm et al., 2003; Tiveron et al., 2006). Experimentos *in vivo* e *in vitro* muestran que CXCL12 es un potente quimioatrayente de interneuronas (Li et al., 2008; Lopez-Bendito et al., 2008; Stumm et al., 2003). Ratones deficientes en CXCL12 o cualquiera de sus receptores (CXCR4 y CXCR7) muestran la

invasión prematura de la PC por parte de las interneuronas (Lopez-Bendito et al., 2008; Sanchez-Alcaniz et al., 2011; Stumm et al., 2003; Wang et al., 2011). Por otro lado, que los ratones deficientes no muestren una disminución en el número de células que llegan a la corteza desde el subpalio, apoya la existencia de otra/s proteína/s que actúan como quimioatrayentes mediando la migración tangencial (Lu et al., 2001). En estadios tardíos, las interneuronas se vuelven insensibles al CXCL12 y cambian de migración tangencial a radial para invadir la PC y diferenciarse. El hecho de que la expresión de CXCL12 se mantenga hasta tarde en el desarrollo y que las interneuronas no pierdan la expresión de CXCR4 (Stumm et al., 2007; Stumm et al., 2003; Tham et al., 2001; Tiveron et al., 2006), induce a pensar que alguna otra molécula, aún por identificar en la PC, medie en esta desensibilización.

1.2.- Neurogénesis y Migración Neuronal en el Adulto en Condiciones Fisiopatológicas

1.2.1- Neurogénesis en el Adulto.

1.2.1.1.- Descubrimiento del nicho neurogénico.

Como consecuencia del proceso natural de envejecimiento, se produce una pérdida de neuronas en el SNC. Cuando la pérdida neuronal es importante, puede llegar a afectar al correcto funcionamiento del cerebro. Éste es, por ejemplo, el caso de la disminución en la capacidad cognitiva asociada al envejecimiento. Determinadas situaciones patológicas pueden acelerar la pérdida neuronal y, como consecuencia, provocar la aparición temprana de los síntomas que ello conlleva.

Durante la primera mitad del siglo pasado, se creía que la generación de neuronas, a partir de progenitores, tenía lugar sólo durante el desarrollo embrionario y en estadios perinatales. Sin embargo, a finales de los años 50, algunos estudios ya mostraban evidencias de proliferación en la ZSV de los **ventrículos** laterales en ratón adulto (Messier et al., 1958) (Fig. 5A), que originaba la formación de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo (Fig. 1B, C) y en el bulbo olfatorio (Fig. 1B) (Altman and Das, 1965a, b). El aislamiento y crecimiento *in vitro* de células con características de célula madre, autorenovación y **multipotencia**, demostró, definitivamente, la existencia de **neurogénesis** en el adulto (Reynolds and Weiss, 1992; Richards et al., 1992). Aunque el aislamiento de NPC permitía la conexión entre la proliferación observada en ZSV y la aparición de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio, todavía se desconocía la identidad de las auténticas células madre neurales (NSC del inglés “neural stem cell”) en el nicho neurogénico de ZSV.

1.2.1.2.- Descripción del nicho neurogénico.

Se define como nicho neurogénico el microambiente que rodea e interacciona con las NSC, que es imprescindible para su mantenimiento y correcta función. En el cerebro adulto existen dos regiones neurogénicas activas: la **zona ventricular** y subventricular (ZV-ZSV) de los ventrículos laterales (Fig. 5A) y la ZSG del giro dentado del hipocampo. El nicho de la ZV-

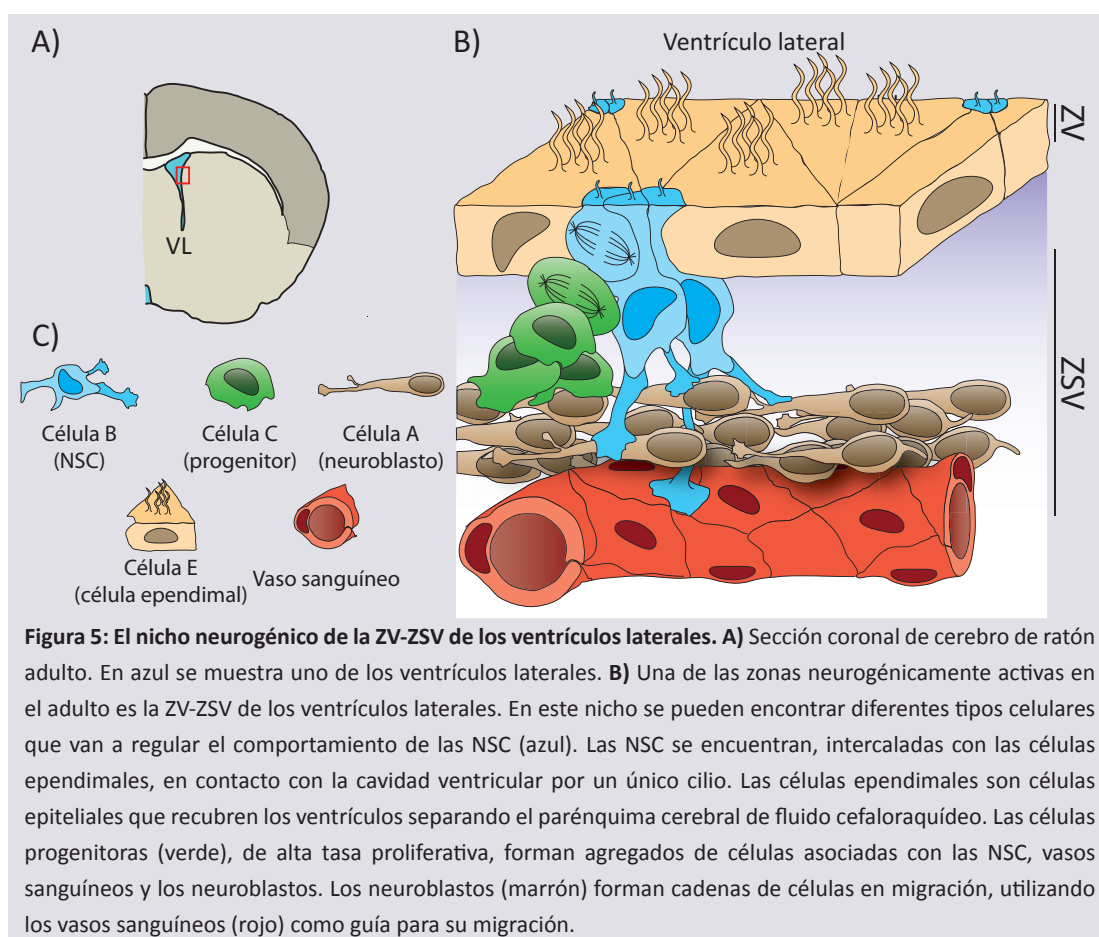


Figura 5: El nicho neurogénico de la ZV-ZSV de los ventrículos laterales. A) Sección coronal de cerebro de ratón adulto. En azul se muestra uno de los ventrículos laterales. B) Una de las zonas neurogénicamente activas en el adulto es la ZV-ZSV de los ventrículos laterales. En este nicho se pueden encontrar diferentes tipos celulares que van a regular el comportamiento de las NSC (azul). Las NSC se encuentran, intercaladas con las células endoteliales, en contacto con la cavidad ventricular por un único cilio. Las células endoteliales son células epiteliales que recubren los ventrículos separando el parénquima cerebral de fluido cefalorraquídeo. Las células progenitoras (verde), de alta tasa proliferativa, forman agregados de células asociadas con las NSC, vasos sanguíneos y los neuroblastos. Los neuroblastos (marrón) forman cadenas de células en migración, utilizando los vasos sanguíneos (rojo) como guía para su migración.

ZSV se compone de distintos tipos celulares organizados de una manera estratificada (figura 5B) (Doetsch et al., 1997):

Células de tipo E (células endoteliales): Son células epiteliales, sin capacidad proliferativa, que constituyen la pared de los ventrículos y presentan numerosos cilios motrices (Del Bigio, 1995) (Fig . 5B).

Células de tipo B (NSC): En condiciones normales se encuentran en estado quiescente y tienen características similares a los astrocitos (Doetsch et al., 1999). Se encuentran adyacentes o intercaladas a la capa de células de tipo E. Están íntimamente asociadas entre sí y en contacto con el líquido cefalorraquídeo de la cavidad ventricular por medio de un único cilio no motriz. También están en contacto directo con la lámina basal de los vasos sanguíneos adyacentes a la ZSV (Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008) (Fig . 5B).

Células de tipo C: Son la descendencia directa de las células de tipo B. A diferencia de éstas, presentan una elevada tasa proliferativa, por lo que se las conoce también como células amplificadoras transitorias. Se encuentran en la ZSV, formando agrupaciones de células cerca de los vasos sanguíneos y manteniendo contacto con las células de tipo B. Son células multipotentes, pero con linaje más restringido y capacidad de **autorrenovación** discutida (Fig . 5B).

Células de tipo A: Son precursores neuronales o neuroblastos. Son descendencia de las células de tipo C. Aunque tienen capacidad proliferativa, son neuronas inmaduras y, por tanto, de linaje determinado. Las células de tipo A forman cadenas de células en migración rostral (Fig. 5B).

Células endoteliales: En la ZSV hay también una extensa red de vasos sanguíneos que, a diferencia de lo que ocurre en el resto del SNC, presentan regiones sin astrocitos por donde las células de tipo B y C contactan directamente con la membrana basal de los vasos (Shen et al., 2008; Tavazoie et al., 2008), permitiendo así el acceso a factores importantes para la regulación de la proliferación de NPC (Fig. 5B).

1.2.1.3.- Migración neuronal en situaciones fisiológicas: Ruta de migración rostral.

El bulbo olfatorio (Fig. 1A, B) tiene como función procesar la información que proviene de las células sensoriales olfativas y enviarla a la corteza olfativa para su procesamiento final. Al bulbo olfatorio llegan un gran número de neuroblastos desde la ZSV a través de la ruta de migración rostral, necesarios para la elevada tasa de recambio diaria (1%) de las interneuronas que lo forman (Gheusi et al., 2000).

Los neuroblastos forman una red de cadenas de células en migración por toda la superficie del ZSV (Lois and Alvarez-Buylla, 1994), utilizando como guía los vasos sanguíneos adyacentes (Whitman et al., 2009). La presencia de CXCL12 secretado por las células endoteliales, incrementa la motilidad de los neuroblastos en la ZSV (Kokovay et al., 2010). En la direccionalidad intervienen, además, proteínas quimiorrepelentes Slit-1 y Slit-2 (Hu, 1999; Hu et al., 1996; Wu et al., 1999). Una vez en la parte frontal de los ventrículos, las cadenas de neuroblastos convergen para formar una única cadena de células, conocida como ruta de migración rostral, que abandona los ventrículos para dirigirse hacia el bulbo olfatorio (Altman and Das, 1965b) (Película 1, Anexo I). A lo largo de su recorrido, la ruta de migración rostral está rodeada por una vaina de astrocitos (tubo glial) que aísla los neuroblastos en migración del parenquima cerebral. Aunque no se conoce ningún gradiente quimiotáctico específico que dirija la migración hacia el bulbo olfatorio, se sabe que la expresión de PSA-NCAM en los neuroblastos, así como la expresión de proteínas de la familia de las netrinas y efrinas, juegan un papel importante en la migración rostral (Marin and Rubenstein, 2003). Una vez alcanzan el bulbo olfatorio, los neuroblastos migran de forma radial a las distintas capas del bulbo olfatorio donde se diferencian en distintos tipos de **interneuronas**.

1.2.1.4.-Potenciales funciones de la neurogénesis en el adulto.

Un buen número de evidencias indica que la **neurogénesis** en el adulto es esencial para la correcta función del bulbo olfatorio y del hipocampo. Las neuronas de reciente formación, una vez han formado sinapsis, muestran hiperexcitabilidad y elevada **plasticidad** sináptica que podría conferirles ventajas en cuanto al procesamiento de información respecto neuronas más viejas (Ming and Song, 2011). Estudios de electrofisiología en secciones de hipocampo, muestran falta de respuesta en el giro dentado cuando se impide la neurogénesis (Snyder et al., 2001), defectos que se reflejan también en estudios de comportamiento (Aimone et al., 2011).

1.2.2.- Migración neuronal en situaciones patológicas.

1.2.2.1- Isquemia cerebral.

La isquemia cerebral es la disminución del aporte energético al cerebro como consecuencia de la disminución del flujo sanguíneo y se origina por bloqueo de una arteria cerebral (isquemia focal) o como consecuencia de una parada cardíaca (isquemia global). En una isquemia global, se produce la pérdida de conciencia en segundos tras la parada cardíaca. Si la isquemia persiste por un tiempo de 5 min, comienza a producirse muerte celular (infarto). El infarto cerebral es una de las principales causas de muerte o discapacidad en humanos y, desafortunadamente, el único tratamiento efectivo es el restablecimiento del flujo sanguíneo (Rossi et al., 2007).

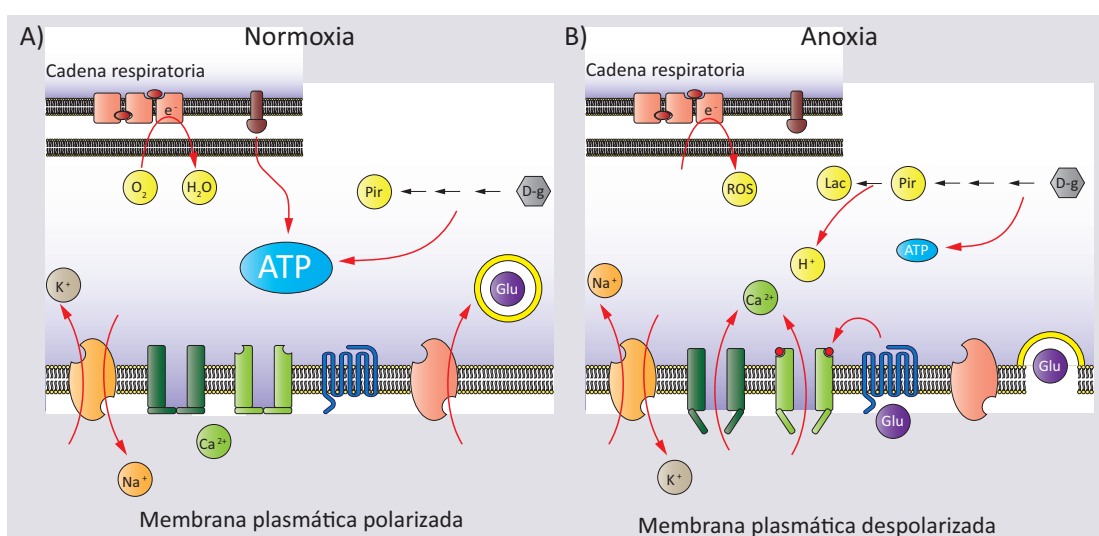
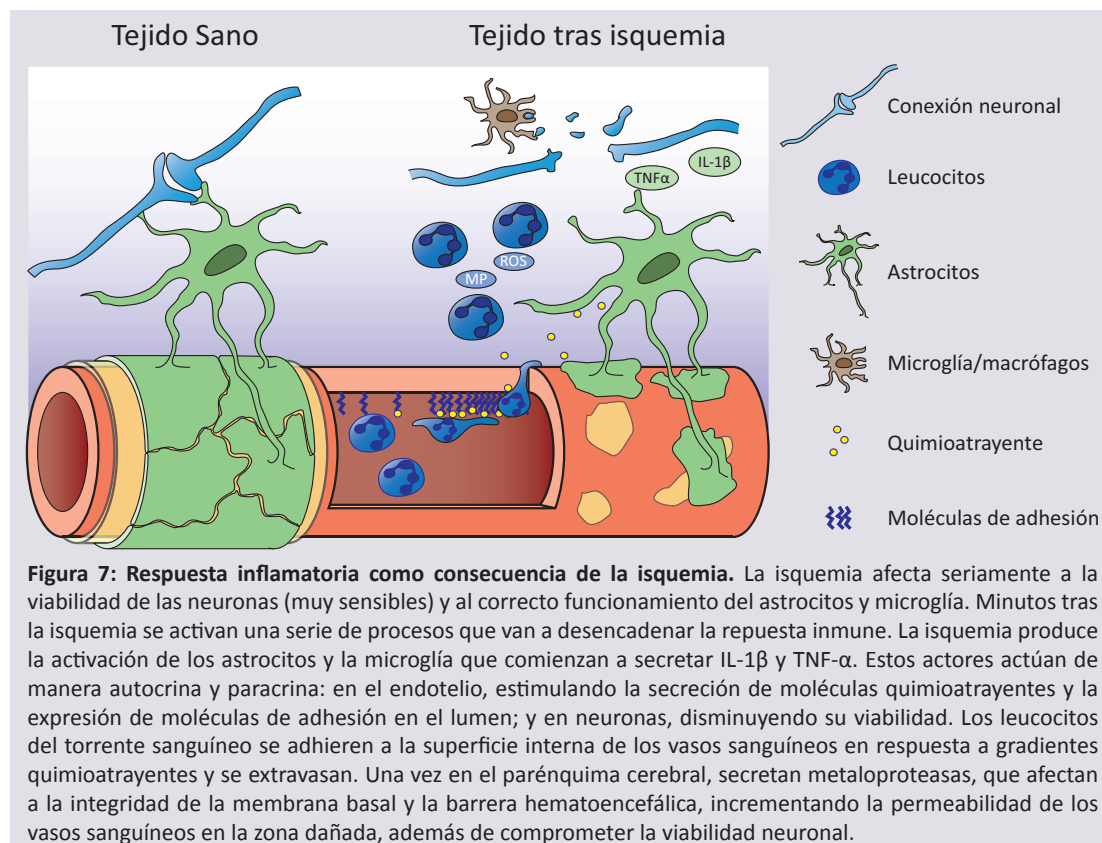


Figura 6: Eventos moleculares que tienen lugar en la célula tras la isquemia. **A)** En condiciones de normoxia y presencia de nutrientes, las células obtienen energía a partir de la cadena respiratoria y de la glucólisis. Así, gran parte del ATP obtenido es utilizado para el mantenimiento de los gradientes iónicos que producen la polarización de la membrana plasmática. Además, los gradientes iónicos sirven para mantener una baja concentración exterior de neurotransmisores evitando la activación de sus receptores en la membrana plasmática. **B)** La caída de los niveles de O_2 y glucosa en la isquemia producen una abrupta caída de los niveles de ATP intracelulares que se asocia a la pérdida de los gradientes iónicos y despolarización de la membrana. Como consecuencia, se produce la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la entrada de Ca^{2+} al citoplasma. El Ca^{2+} va a estimular la secreción de neurotransmisores (Glutamato, morado) que al unirse a su correspondiente receptor activan canales de Ca^{2+} dependientes de ligando, produciéndose una nueva entrada de Ca^{2+} . De esta manera, se produce un ciclo de retroalimentación positiva que provoca la muerte celular por excitotoxicidad. Además, la ausencia de O_2 como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria provoca la formación de radicales libres que dañan las estructuras celulares. Por otro lado, las condiciones anaeróbicas fuerzan a la transformación del piruvato, obtenido en la glucólisis, en lactato, lo que conlleva la acidificación del medio, afectando a la actividad de numerosos procesos celulares.

La falta de O_2 provoca una disminución brusca de los niveles de ATP en la célula afectada (Silver et al., 1997) (Fig. 6B). Además, la falta de O_2 como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria, hace que se generen de manera transitoria radicales libres que agravan la situación (Abramov et al., 2007). En estas condiciones de anoxia, la glucólisis provoca la reducción del pH intracelular por la reducción del piruvato a lactato (Silver et al., 1997) (Fig. 6B). En minutos, tras la isquemia, como consecuencia de la caída de los niveles de ATP, se produce: la pérdida de los gradientes iónicos, la despolarización de la membrana plasmática y el fallo del transportador de glutamato, con lo que éste se acumula en el espacio extracelular (Fig.

6B). El glutamato activa los receptores de NMDA en la superficie de las células, promoviendo una mayor despolarización de la membrana, una mayor pérdida de los gradientes iónicos y un aumento del Ca^{2+} intracelular que promueve la liberación de más glutamato al espacio extracelular (Fig. 6B). Finalmente, se produce la muerte por excitotoxicidad de neuronas y oligodendrocitos, primero, y de astrocitos, posteriormente (Arundine and Tymianski, 2004; Nicholls et al., 2007).



En los alrededores del núcleo de la isquemia (zona de penumbra), el bloqueo del flujo sanguíneo no es total (Lipton, 1999). En esta zona se producen una serie de despolarizaciones transitorias que pueden evolucionar a una despolarización terminal, produciéndose la expansión del infarto, o a la recuperación de los gradientes iónicos y estabilización, dependiendo de la duración de la isquemia (Nedergaard and Hansen, 1993).

1.2.2.2- Isquemia e inflamación.

Poco después de producirse la isquemia, en la zona anóxica se activan las células de la microglía y los astrocitos, que junto con las neuronas y células del endotelio capilar, liberan citoquinas proinflamatorias y quimioquinas al medio extracelular (Fig. 7). A tiempos cortos, tras la isquemia, comienzan a expresarse IL-1 β , TNF- α e IL-6, cuya expresión aumenta en las siguientes horas (Buttini et al., 1994; Liu et al., 1994; Liu et al., 1993; Zhang et al., 1998). Estas citoquinas pro-inflamatorias estimulan la expresión de determinadas quimioquinas en astrocitos y en células de la microglia: CCL2 (Gourmala et al., 1997; Kim et al., 1995), CCL3 (Gourmala et al., 1999; Kim et al., 1995), CXCL8 (Matsumoto T, 1997; Matsumoto et al., 1997) y CXCL12 (Stumm et al., 2002).

Los vasos sanguíneos muestran también una serie de cambios en respuesta a la isquemia focal. Por un lado, disminuyen las proteínas que constituyen la lámina basal, por la disminución de su síntesis (Hamann et al., 1995) y por el aumento de su degradación (Chang et al., 2003) (Fig. 7), que produce un aumento de la permeabilidad de los vasos y formación de edema en la región isquémica (Heo et al., 2005). Las citoquinas liberadas inducen un aumento de los niveles de moléculas de adhesión en la cara luminal de las células endoteliales como P-selectina (Pinsky et al., 1996), ICAM-1, ICAM-2 y VCAM-1 (Frijns and Kappelle, 2002), que junto con las quimioquinas, median la adhesión y extravasación de leucocitos (sobre todo neutrófilos y monocitos) al parenquima cerebral (Garcia et al., 1994) (Fig. 7). La acumulación de neutrófilos en los vasos sanguíneos puede llegar a bloquearlos, impidiendo la **reperfusión** tras la isquemia, lo que puede agravarse aún más por la activación de la agregación plaquetaria (Zhang et al., 1994). Una vez en el parénquima, los leucocitos secretan al medio extracelular metaloproteasas, aumentando el daño a la barrera hematoencefálica (Justicia et al., 2003), y producen radicales libres que comprometen la viabilidad de las células en la zona de la lesión.

Además de iniciar la cascada inflamatoria, los astrocitos también desempeñan funciones neuroprotectoras importantes, como la retirada de glutamato del medio extracelular (Rothstein et al., 1996), la protección al estrés oxidativo (Shih et al., 2003), la reparación de la barrera hematoencefálica, la reducción de edema en la lesión y la recuperación del balance iónico (Zador et al., 2009). Parte de estas funciones neuroprotectoras se producen por la formación de una barrera física de astrocitos (cicatriz glial) que aísla la región dañada del tejido sano evitando la propagación de la lesión y favoreciendo la regeneración (Sofroniew, 2009).

1.2.2.3- Neurogénesis e isquemia cerebral.

El descubrimiento de la **neurogénesis** en el cerebro adulto suscitó la idea de que en el SNC, al igual que ocurre en otros tejidos, se dieran también procesos de regeneración y reemplazamiento celular en situaciones patológicas. Tras un daño agudo como el que supone un infarto cerebral, se estimula la proliferación de NPC en el nicho neurogénico (Arvidsson et al., 2002; Jin et al., 2001). Además, tras la isquemia, se produce la activación de otros tipos celulares, como células endimales (Carlen et al., 2009) u otros tipos de NPC dispersos en la corteza cerebral (Ohira et al., 2010).

El incremento de neuroblastos en la ZV-ZSV se mantiene por un tiempo prolongado para proporcionar neuronas para la recuperación del tejido dañado (Thored et al., 2006). Tras la isquemia, los neuroblastos abandonan su ruta de migración fisiológica, hacia el bulbo olfatorio, para dirigirse hacia la lesión (Arvidsson et al., 2002; Thored et al., 2006), formando cadenas de células en migración asociadas con los vasos sanguíneos (Thored et al., 2007; Yamashita et al., 2006; Zhang et al., 2009). Una vez en la lesión, los neuroblastos prosiguen con su programa de diferenciación dando lugar a los tipos neuronales típicos de la región dañada y se integran en los circuitos neuronales existentes (Arvidsson et al., 2002; Thored et al., 2006).

1.2.2.4- Recuperación y Transplante de NPC.

La pérdida neuronal tras un infarto focal es muy grande, pero, en muchos casos, los pacientes sobreviven y experimentan una recuperación funcional espontánea (Murphy and Corbett, 2009). Aunque en modelos animales se ha observado la formación de nuevas neuronas a partir de precursores endógenos en la zona dañada (Arvidsson et al., 2002; Thored et al., 2006), se sabe que el reemplazamiento es muy inferior al número de neuronas perdidas. Por tanto, la recuperación funcional observada se debe a mecanismos de compensación y **plasticidad** sináptica de los circuitos existentes en las regiones no dañadas cercanas al infarto (Murphy and Corbett, 2009). Por ello, se especula si la terapia celular puede potenciar estos mecanismos (Bliss et al., 2007).

El transplante de NPC y de otros tipos de células madre, como terapia en medicina regenerativa tras el infarto, muestra, en la mayoría de los estudios en modelos animales, una mejoría en la recuperación funcional tras el transplante (Bacigaluppi et al., 2008; Bliss et al., 2007). Además, en ensayos clínicos en humanos, aunque realizados con grupos reducidos de pacientes, se observan efectos beneficiosos de la terapia celular en el tratamiento del infarto cerebral (Kondziolka et al., 2005; Kondziolka et al., 2000; Meltzer et al., 2001; Nelson et al., 2002; Savitz et al., 2005). Se han propuesto varios mecanismos que explican estos efectos beneficiosos: **1) Mecanismo neuroprotector:** En muchos estudios se ha visto una reducción significativa del tamaño de la lesión tras el transplante y también una reducción de la apoptosis en zona de la penumbra. Esto podría deberse a que las células transplantadas secreten factores neuroprotectores como VEGF (del inglés “vascular endothelial growth factor”), FGF (del inglés “fibroblast growth factor”), GDNF (del inglés “glial-derived growth factor”) o BDNF (del inglés “brain-derived growth factor”) (Llado et al., 2004; Ourednik et al., 2002). **2) Promover plasticidad neuronal:** Aunque este efecto ha sido demostrado sólo en el caso de epilepsia (Shetty et al., 2005). **3) Neovascularización:** En los primeros días, tras isquemia, tiene lugar una intensa reorganización de vasos sanguíneos y se asocia con buena prognosis en la evolución del infarto. El transplante de células madre de la médula ósea y NPC, tras el infarto, favorece significativamente estos procesos, posiblemente por la secreción de factores angiogénicos como VEGF y CXCL12 (Jiang et al., 2005; Shen et al., 2006). **4) Inmunomodulación:** NPC transplantadas disminuyen la inflamación secretando al medio factores anti-inflamatorios. Hasta ahora, este efecto ha sido demostrado sólo en modelos murinos de encefalomielitis alérgica experimental (Bacigaluppi et al., 2009; Pluchino et al., 2005).

1.2.2.5- CXCL12 y migración de NPC en isquemia.

Muchos estudios demuestran el reclutamiento de NPC y de otros tipos de progenitores a los alrededores del área infartada (Arvidsson et al., 2002; Thored et al., 2006; Thored et al., 2007; Yamashita et al., 2006), sugiriendo que en el ambiente inflamatorio que tiene lugar tras la isquemia, se secretan sustancias quimioatrayentes que, además de atraer leucocitos, participan también en el reclutamiento de NPC. Tras la hipoxia, el factor de transcripción inducido por hipoxia (HIF-1 α , del inglés “hipoxic induced factor”) se une al promotor de CXCL12 incrementando su expresión (Ceradini et al., 2004). Técnicas de hibridación *in situ*, ELISA,

inmunofluorescencia y RT-PCR confirman la expresión de CXCL12 en la zona que rodea al infarto (Bacigaluppi et al., 2009; Imitola et al., 2004; Schonemeier et al., 2008a; Stumm et al., 2002; Thored et al., 2006). Puesto que las NPC expresan CXCR4, es muy probable que CXCL12 regule la migración de NPC a la zona infartada.

En experimentos *in vitro*, las NPC migran hacia el infarto en ensayos con explantes de tejido que han sufrido isquemia (Imitola et al., 2004; Robin et al., 2006) de manera dependiente de CXCL12, ya que el tratamiento con un anticuerpo monoclonal (mAb, del inglés “monoclonal antibody”) bloqueante de CXCR4 impide el proceso. En experimentos *in vivo*, la inyección intraventricular de AMD3100 (inhibidor específico de CXCR4) muestra una clara acumulación de NPC endógenos en la ZSV y una reducción significativa del número de células encontradas en el área infartada en comparación con los ratones control (Thored et al., 2006). NPC transplantadas en el zona periventricular, tanto del hemisferio contralateral como del ipsilateral, migran hacia la lesión en respuesta al CXCL12 expresado por los astrocitos en el área del infarto (Imitola et al., 2004).

1.3.- Quimioquinas: Citoquinas Quimioatrayentes

1.3.1.- CXCL12 y sus receptores.

Las quimioquinas son pequeñas proteínas (8 kDa) con propiedades quimioatrayentes que actúan a través de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR, del inglés “G protein couple receptors”). Aunque originalmente fueron descritas por su capacidad de atraer a células del sistema inmunológico al foco inflamatorio, su función no está sólo restringida a dicho sistema. A diferencia de las quimioquinas inflamatorias (inducibles), las quimioquinas homeostáticas se expresan en gran variedad de tejidos de forma constitutiva regulando, por ejemplo, la localización, la proliferación y la supervivencia celular. Un ejemplo de quimioquina homeostática sería CXCL12, de la que existen varias isoformas, tres isoformas en ratón (Janowski, 2009; Stumm et al., 2007; Torres and Ramirez, 2009). La isoforma más abundante es la de 89 aa también conocida como factor derivado de estroma (SDF-1 α , del inglés “stromal cell-derived factor”), debido a que se aisló por primera vez a partir de una línea de células de estroma de ratón (Tashiro et al., 1993). Además de su amplia distribución en el organismo y su expresión constitutiva, la localización cromosómica del gen indica también que la función de CXCL12 es distinta a la de otras quimioquinas. Mientras los genes de la mayoría de las quimioquinas están agrupados en los cromosomas 4q y 17q (en humano) sugiriendo una regulación conjunta de estos genes ante una situación inflamatoria, el gen que codifica para CXCL12 se encuentra aislado en el cromosoma 10q (Shirozu et al., 1995).

En la actualidad, se conocen dos receptores específicos de CXCL12, CXCR4 (Bleul et al., 1996; Oberlin et al., 1996) y CXCR7 (Balabanian et al., 2005). Mientras que CXCR4 une exclusivamente esta quimioquina, CXCR7 une CXCL11 y CXCL12. La unión de CXCL12 a CXCR4 desencadena en la célula la activación de varias cascadas de señalización típicas de quimioquinas. Sin embargo, CXCR7 se describió inicialmente como un receptor silencioso, proponiéndose que su acción sería regular la actividad de CXCR4 por varios mecanismos. El primero, sería la de capturar CXCL12 del medio extracelular, regulando así la cantidad de CXCL12 disponible para interactuar con CXCR4 (Boldajipour et al., 2008). Por otro lado, CXCR7 y CXCR4 forman complejos heterodiméricos en la membrana celular. En este sentido,

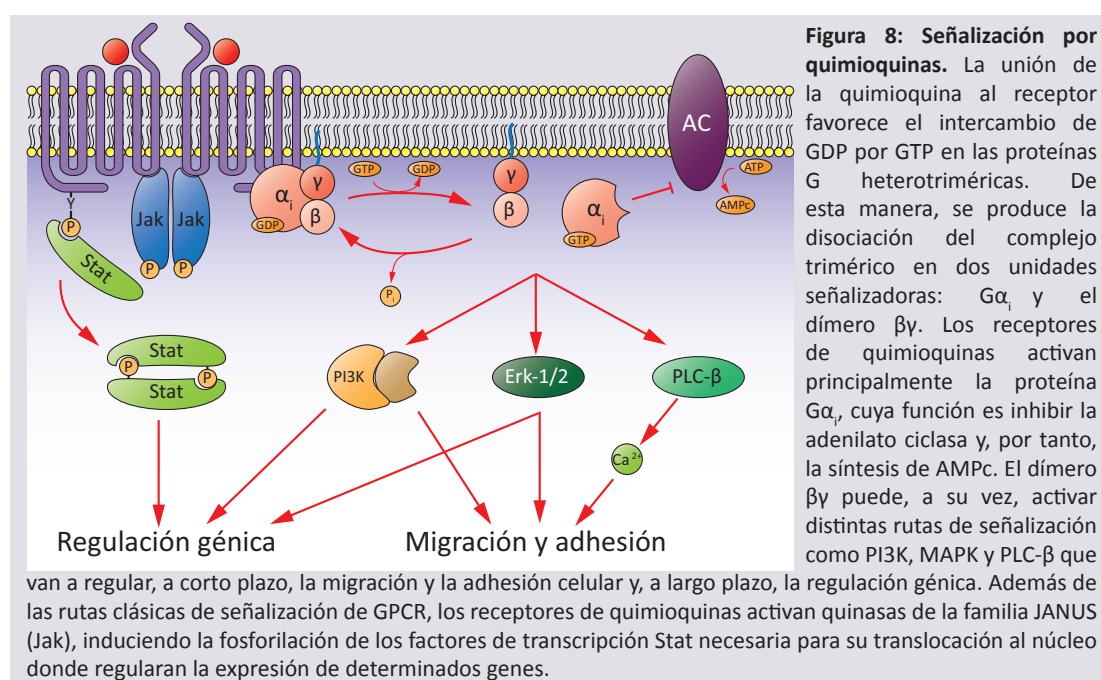
el complejo modifica la respuesta final de la célula tras la estimulación con CXCL12 (Levoye et al., 2009). Además, hoy sabemos que CXCR7 señala por mecanismos diferentes a los de CXCR4 (Rajagopal et al., 2010; Xiao et al., 2010).

Mientras que el ratón deficiente en CXCR7 presenta alteraciones en la generación de las válvulas cardíacas, el fenotipo del ratón deficiente en CXCR4 es muy similar al deficiente en su ligando, CXCL12. Esta mutación produce la muerte en estadios perinatales, mostrando varios defectos en el desarrollo: linfopoyésis de linfocitos B impedida (Ma et al., 1998; Nagasawa et al., 1996; Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998), defecto en mielopoyesis en la médula ósea (Ma et al., 1998; Nagasawa et al., 1996; Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998), en la formación del septum ventricular (Nagasawa et al., 1996; Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998), en la vascularización del tracto intestinal (Tachibana et al., 1998), en la laminación del cerebelo (Ma et al., 1998; Zou et al., 1998) y de la corteza cerebral (Stumm et al., 2003).

1.3.2.- Señalización por quimioquinas.

1.3.2.1- Proteínas G heterotriméricas.

Las proteínas G heterotriméricas inician los mecanismos de transducción de señales dependientes de GPCR. Las proteínas G heterotriméricas están constituidas por tres subunidades diferentes: subunidad α , subunidad β y subunidad γ . Las subunidades β y γ forman un heterodímero anclado a la membrana plasmática por la subunidad γ . La subunidad α tiene afinidad por nucleótidos de guanosina. Cuando α se encuentra unido a GDP, interacciona con el dímero $\beta\gamma$ permaneciendo el complejo inactivo. La unión del ligando al receptor promueve un cambio conformacional en el receptor que permite la interacción con la proteína G facilitando el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α (Fig. 8). Esto, permite la disociación del complejo trimérico, dando lugar a dos unidades señalizadoras activas: la proteína α -GTP y el dímero $\beta\gamma$. La vuelta al estado inactivo se debe a la capacidad GTPasa intrínseca de la



subunidad α que, tras hidrolizar el GTP, vuelve a interaccionar con el dímero $\beta\gamma$ (Alberts et al., 2002) (Fig. 8). La actividad GTPasa de la subunidad α es lenta, pero puede ser estimulada por las proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGS, del inglés “regulator of G protein signaling”) (Hollinger and Hepler, 2002).

La señalización mediada por CXCR4, al igual que por el resto de receptores de quimioquinas (Damaj et al., 1996; Frade et al., 1997; Mellado et al., 1998; Rodríguez-Frade et al., 1999), es sensible al tratamiento con toxina pertúsica (Ptx, del inglés “Pertussis toxin”) que produce la ADP ribosilación de G_i , impidiendo la interacción con el receptor y permaneciendo irreversiblemente unida a GDP y, por tanto, inactiva (Alberts et al., 2002). Además de G_i , CXCR4 activa alternativamente otras proteínas G como G_q , G_{11} , G_{12} ó G_{13} (Wright et al., 2002), lo que podría indicar que la especificidad proteína G-receptor es dependiente del tipo celular o de los factores extracelulares que afectan al estado de la célula (Arai and Charo, 1996).

1.3.2.2.- Activación de la ruta Jak/Stat (Janus kinase/ Signal transducer and activator of transcription).

Los receptores de citoquinas se encuentran formando dímeros en la superficie celular y no poseen actividad enzimática intrínseca. En su cara citoplasmática, presentan constitutivamente asociadas las proteínas de la familia JANUS quinasa, que tienen actividad tirosina quinasa. La unión de la citoquina a su receptor promueve la fosforilación cruzada de las proteínas Jak, adquiriendo su máxima actividad (Fig. 8). La fosforilación del receptor forma sitios de anclaje para los factores de transcripción de la familia Stat, que tienen dominios de homología con Src 2 (SH2, del inglés “Src homology 2”) de alta afinidad por tirosinas fosforiladas, haciéndoles accesibles a la actividad tirosina quinasa de los Jak (Fig. 8). Los Stat fosforilados forman complejos diméricos (Shuai et al., 1996), que se traslocan al núcleo para regular la expresión génica (Horvath et al., 1995; Shuai et al., 1994; Xu et al., 1996) (Fig. 8).

La activación de la ruta JANUS quinasa se ha relacionado también con los receptores de quimioquinas (Mellado et al., 1998; Soriano et al., 2003; Vila-Coro et al., 1999; Wong and Fish, 2003) produciéndose de manera semejante a como ocurre en la señalización por citoquinas (Mellado et al., 1998; Vila-Coro et al., 1999). A diferencia de lo que ocurre en receptores de citoquinas, la asociación de las Jak al receptor de quimioquinas no es constitutiva y requiere de la activación previa del receptor por el ligando. Sin embargo, el hecho de que los receptores de quimioquinas formen complejos oligoméricos (Babcock et al., 2003; Muñoz et al., 2011; Vila-Coro et al., 1999), sugiere que el mecanismo de activación de la ruta Jak/Stat sea semejante a como ocurre en el caso de las citoquinas. La activación de los Jak por receptores de quimioquinas es necesaria para la activación de rutas de señalización de GPCR canónicas, como la activación de las proteínas G heterotriméricas (Soriano et al., 2003) responsables de la iniciación del resto de eventos característicos de la señalización por quimioquinas.

Tras un estímulo externo, la célula ha de tener mecanismos reguladores que finalicen las rutas iniciadas, de manera que la célula pueda volver a la situación inicial. La ruta Jak/Stat puede ser inactivada, por impedimento de la actividad transcripcional de los Stat, por las

proteínas PIAS (del inglés “Protein inhibitor of activated Stat”) (Arora et al., 2003; Chung et al., 1997; Liu et al., 2001; Liu et al., 1998); por desforforilación de las Jak debido a la actividad de proteínas tirosina fosfatasas de la familia SHP (del inglés “SH2-containing protein tyrosine phosphatase”) (David et al., 1995; Neel, 1993; Pei et al., 1994) y por la expresión de proteínas supresoras de la señalización por citoquinas (SOCS, del inglés “Supresor of cytokine signaling”), que bloquean la actividad de los Jak y, además, los marcan para su degradación (Fujimoto and Naka, 2003; Hilton et al., 1998; Kamura et al., 2001; Kamura et al., 1998; Starr et al., 1997; Yoshimura, 2005; Zhang et al., 1999).

1.3.2.3.- Activación de MAPK (mitogen-activated protein kinase).

Es una familia de serin/treonina quinasas utilizada por gran variedad de receptores para transmitir las señales extracelulares al interior celular de: hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas. Su función principal es la de regular la expresión génica, así como la actividad de algunas enzimas, participando en proliferación, diferenciación y apoptosis (Cahill et al., 1996).

Las MAPK se dividen en tres subfamilias: Erk (del inglés “extracellular signal-regulated kinases”), JNK (del inglés “c-Jun N-terminal kinase”) y p38MAPK (Farooq and Zhou, 2004). Todas deben ser fosforiladas en una treonina y una tirosina en el motivo T-X-Y, para estar en estado activo (Goldsmith et al., 2004) por una cascada de quinasas específica de cada subfamilia.

La activación de MAPK por quimioquinas (Fig. 8) ha sido descrita en varios sistemas celulares. Por ejemplo, CXCL12 activa Erk-1/2 en linfocitos B y T (Balabanian et al., 2005; Schabath et al., 2006) y también en células tumorales (Peng et al., 2005; Schabath et al., 2006). En neutrófilos, el tratamiento con Ptx bloquea la activación de la cascada de las MAPK activada por quimioquinas, indicando que el proceso es dependiente de la proteína G_i , en concreto, del dímero $\beta\gamma$ (Crespo et al., 1994; Koch et al., 1994).

1.3.2.4.- Proteínas lipasas y movilización de Ca^{2+} intracelular.

La migración celular promovida por quimioquinas requiere un aumento transitorio de los niveles citosólicos de Ca^{2+} para regular la función de varias proteínas motoras. La liberación del dímero $\beta\gamma$ de la proteína G heterotrimérica mediada por el receptor de quimioquinas activa, entre otras dianas, a proteína lipasa C β (PLC β) (Fig. 8), que hidroliza fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato para dar diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3). El DAG, por su naturaleza lipídica, recluta a la membrana plasmática y activa a varios miembros de la familia de las PKC. Por otro lado, IP_3 difunde por el citosol y abre en el retículo endoplasmático los canales de Ca^{2+} dependientes de IP_3 (Alberts et al., 2002) (Fig. 8).

1.3.1.5.- Desensibilización, internalización y reciclaje de GPCR.

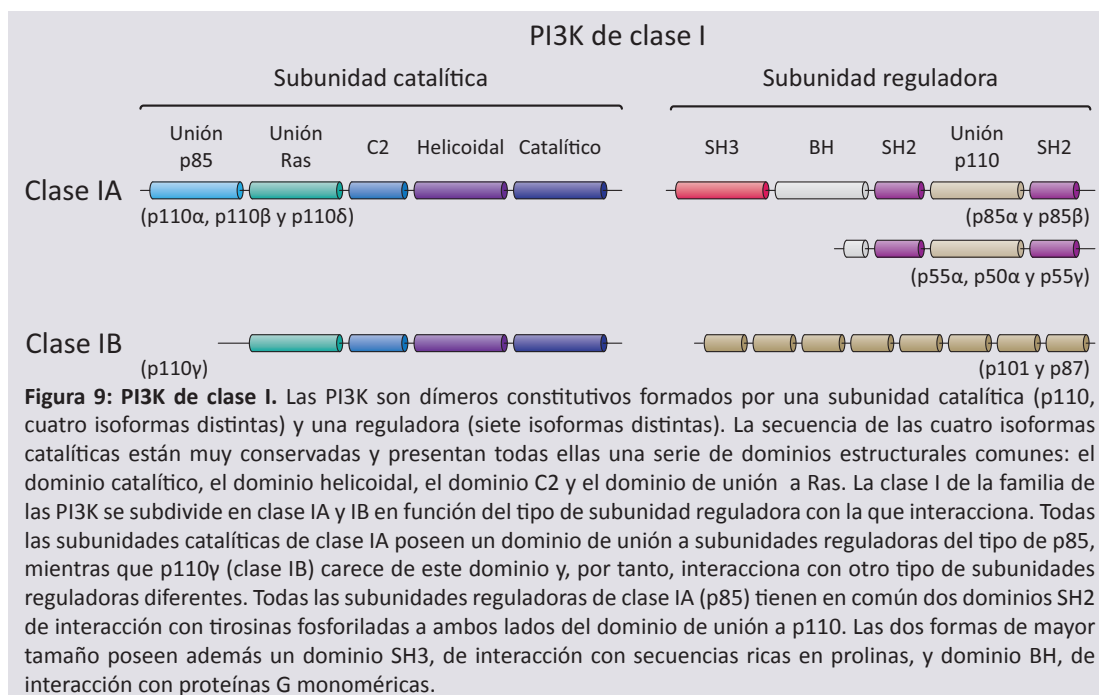
Tras la unión ligando-receptor, se inician mecanismos intracelulares que hacen que

receptores libres en la membrana plasmática se vuelvan insensibles al ligando (desensibilización). Los mecanismos de desensibilización requieren la fosforilación en serinas/treoninas del extremo carboxilo terminal del GPCR mediada por GRK (**desensibilización homóloga**) o PKA/PKC (**desensibilización heteróloga**). Esto permite la interacción de proteínas de la familia de las arrestinas con los GPCR, impidiendo la unión de la proteína G y promoviendo su internalización vía vesículas de clatrina. Una vez en el compartimento endosomal, los GPCR pueden reciclarse volviendo a la membrana plasmática o ir a lisosomas para su degradación (Alberts et al., 2002).

1.4.- Señalización Vía Fosfatidilinositol 3-Quinasa

1.4.1.- Clasificación.

Las enzimas de la familia fosfatidilinositol 3-quinosas (PI3K, del inglés “phosphoinositide 3-kinase”) fosforilan el grupo hidroxilo de la posición 3 del anillo de inositol de fosfatidilinositoles. La familia de las PI3K se clasifica en clases I, II y III en función de características estructurales y de la preferencia por el sustrato. Así se forman tres especies distintas de fosfatidilinositol-3-fosfato: fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP), PI-3,4-bisfosfato (PIP₂) y PI-3,4,5-trisfosfato (PIP₃). La fosforilación de estos lípidos en la membrana plasmática permite el reclutamiento y activación de múltiples proteínas. Entre ellas, con dominios de homología con la plecstrina (dominios PH, Pleckstrin homology domain), con dominios PX (phox homology domain, PX domain) y con dominios FIVE. Las diferentes PI3K participan en muchos procesos celulares, progresión del ciclo celular, crecimiento celular, supervivencia, migración y tráfico vesicular (Vanhaesebroeck et al., 2010). Sin embargo, la participación de



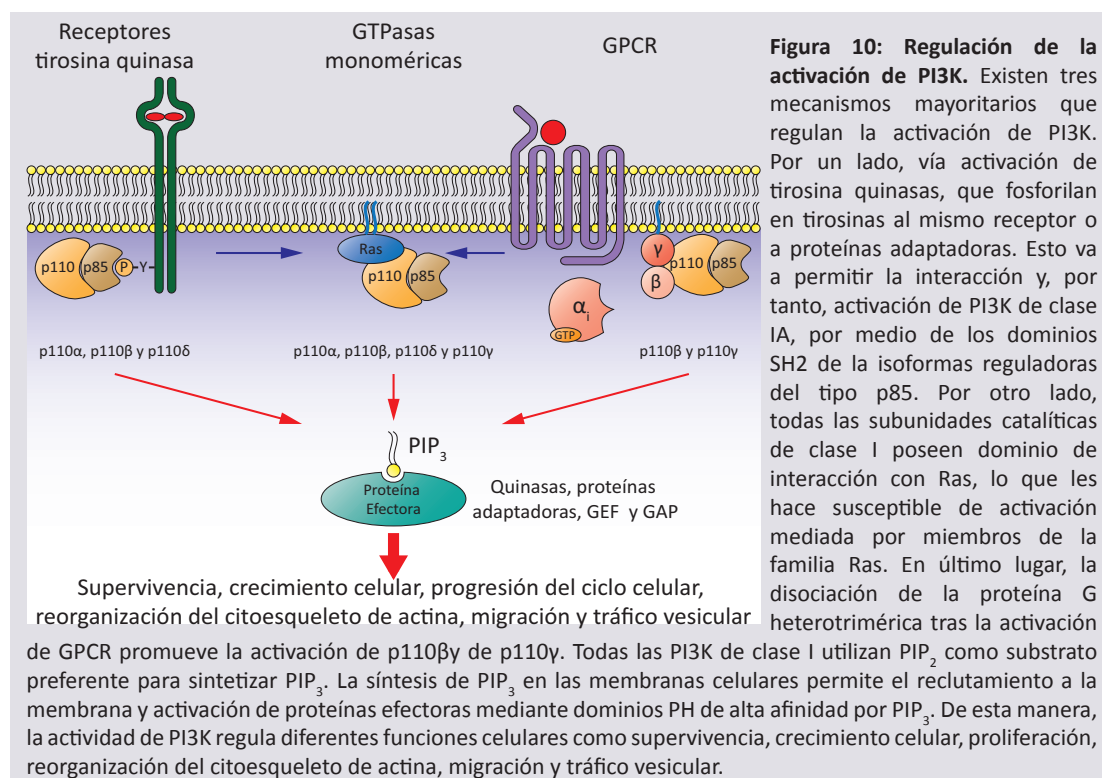
las distintas isoformas en cada uno de estos procesos no es del todo conocida (Vanhaesebroeck et al., 2010).

Las PI3K se caracterizan por encontrarse constitutivamente como heterodímeros, constituidos por una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (existen varias subunidades reguladoras distintas aunque la más común es p85). Existen cuatro isoformas diferentes de p110 (α , β , δ y γ) que presentan una gran homología entre sí y son codificadas por genes distintos (Fig. 9). Atendiendo a su capacidad de interactuar con la subunidad reguladora p85, las PI3K de clase I se subdividen en clase IA, que interactúan con isoformas de p85 (p110 α , p110 β y p110 δ), y clase IB, que interactúa con proteínas reguladoras distintas a p85 (p110 γ) (Fig. 9). Las células de mamífero expresan todos los tipos de PI3K de clase I, aunque las isoformas p110 δ y p110 γ se expresan preferentemente en leucocitos (Kok et al., 2009). En un principio, la subdivisión en clases IA y IB servía para diferenciar aquellas PI3K que señalaban vía tirosina quinasas o vía GPCR, respectivamente. Sin embargo, cada vez son más los estudios que indican que la división no es del todo cierta (Guillemet-Guibert et al., 2008).

1.4.2.- Regulación de la activación de PI3K.

1.4.2.1.- Por subunidades reguladoras.

En mamíferos, existen cinco subunidades reguladoras de la clase IA (generalmente conocidas como p85) de distinto tamaño (Fig. 9) y codificadas por tres genes distintos. Todas las p85 pueden interactuar con las tres subunidades catalíticas de clase IA. En situación basal, la subunidad reguladora bloquea la actividad catalítica de p110 y la mantiene en el citosol. Ante determinados estímulos externos, PI3K es reclutada a la membrana plasmática por la interacción de los dominios SH2 de la subunidad reguladora con tirosinas fosforiladas



(Fig. 9). Un cambio conformacional libera entonces el centro activo de p110, permitiendo el acceso a su sustrato en la membrana plasmática. Las subunidades reguladoras p85 α y p85 β poseen además dominios SH3 (del inglés “Src homology 3”) que tienen afinidad por secuencias ricas en prolinas presentes en algunas proteínas como mecanismo de regulación adicional (Fig. 9). Las PI3K presentan también dominios BH (del inglés “BCR homology domain”) (Fig. 9) pudiendo actuar como proteína activadora de la actividad GTPasa (GAP, del inglés “GTPase activating protein”) de proteínas G monoméricas de la familia Rab (Chamberlain et al., 2008). La clase IB solo posee dos subunidades reguladoras p101 y p87 que carecen de dominios SH2. Son importantes para la activación de p110 γ vía GPCR y Ras (Fig. 9).

1.4.2.2.- Por Ras.

Todas las subunidades catalíticas de las PI3K de clase I poseen un dominio de unión a Ras (RBD, del inglés “Ras binding domain”) (Fig. 9) que las hace susceptibles de una activación directa por miembros de esta familia (Delgado et al., 2009; Gupta et al., 2007; Marques et al., 2008; Suire et al., 2006) (Fig. 10).

Otras GTPasas monoméricas pueden también regular la actividad de PI3K. Por ejemplo, p110 β interacciona con Rab5 (Kurosu and Katada, 2001), lo que explica su presencia en vesículas de clatrina y su implicación en la formación de endosomas tempranos (Shin et al., 2005). Además, las isoformas de p85 pueden interaccionar con Rac, Rho y Cdc42, resaltando posibles mecanismos de retroalimentación positiva, pues PI3K puede activar GTPasas monoméricas (Vanhaesebroeck et al., 2010).

1.4.2.3.- Por GPCR.

Desde su descubrimiento, p110 γ se asoció a GPCR por ser la única PI3K de clase I cuyas subunidades reguladoras interaccionaban con el dímero $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas, y además sus subunidades reguladoras no poseían dominios SH2, lo que imposibilitaba su activación directa por tirosina quinasas (Stoyanov et al., 1995). Actualmente, numerosos estudios indican una activación directa de p110 β y p110 γ por GPCR (Figura 10), mientras p110 α y p110 δ señalarían vía tirosina quinasas (Guillermet-Guibert et al., 2008). Así se ha propuesto que p110 α y p110 β estarían involucradas en la señalización vía tirosina quinasas y GPCR, respectivamente, en todos los tipos celulares. Mientras que p110 δ y p110 γ jugarían un papel importante en la señalización vía tirosina quinasas y GPCR, respectivamente, en leucocitos (Guillermet-Guibert et al., 2008). Esta separación no es excluyente, ya que, tanto tirosina quinasas como GPCR activan Ras y, por tanto, todas las subunidades catalíticas de clase I son susceptibles de ser activadas por cualquiera de las rutas (Alvarez et al., 2009; Rosano et al., 2009; Rubio et al., 2003). Además, la fosforilación de GPCR, en tirosinas, tras su activación en los dominios citosólicos, podría funcionar como puntos de anclaje para PI3K de clase IA a través de los dominios SH2 (Bousquet et al., 2006).

1.4.3.- Funciones de PI3K de clase I.

La formación de PIP_3 en membranas permite el reclutamiento de proteínas con dominios PH de afinidad por PIP_3 y PIP_2 . Entre estas proteínas se encuentran enzimas con actividad serin/treonina quinasa (Akt), tirosina quinasa (BTK), proteínas adaptadoras (GAB2) y reguladores de GTPasas monoméricas (GEF y GAP).

Una de las vías de señalización más estudiadas, iniciada por PI3K, es la activación de Akt. Esta serin/treonina quinasa se une a la membrana por medio de su dominio PH. Una vez en la membrana, Akt es accesible a PDK1 (del inglés “phosphoinositide dependent kinase 1”) y mTORC2 (del inglés “mammalian target of rapamycin complex 2”) que van a fosforilar y, por tanto, activar a Akt en los residuos Thr 308 y Ser 473 respectivamente (Alessi et al., 1996; Alessi et al., 1997; Sarbassov et al., 2005). Además, la presencia en la membrana de PDK1 y mTORC2 es dependiente de la actividad de PI3K ya que ambas poseen dominios PH para interaccionar con PIP_3 .

Como hemos dicho anteriormente, PI3K regula la actividad de GTPasas monoméricas como Rac, Ras y Arf, regulando la actividad de sus GAP y GEF. A diferencia de lo que ocurre con la activación de Akt, parece que la regulación de diferentes GTPasas monoméricas podría ser mediada de manera específica por los distintos miembros de PI3K de clase I (Vanhaesebroeck et al., 2010).

Como mecanismo de regulación negativo, la fosfatasa PTEN desfosforila PIP_3 apagando la señalización iniciada por PI3K.

1.4.4.- Función de p110 β .

La subunidad catalítica p110 β , como perteneciente a la clase IA de PI3K, es susceptible de ser activada por tirosina quinasas. Sin embargo, varios estudios asocian su activación también a GPCR, sugiriendo la actuación sinérgica con tirosina quinasas y GPCR para una máxima activación de p110 β (Hazeki et al., 1998; Kubo et al., 2005; Maier et al., 1999; Tang and Downes, 1997). El uso de ratones modificados genéticamente, así como el uso de inhibidores específicos, ha demostrado que p110 β participa en la señalización vía GPCR en aquellos tipos celulares que no expresan p110 γ (Guillermet-Guibert et al., 2008). Apoyando estos resultados, se ha visto que la migración inducida por la quimioquina CXCL12 en células endoteliales está totalmente bloqueada en células deficientes en actividad p110 β . Sin embargo, las mismas células migran correctamente cuando se usa un estímulo independiente de GPCR, como es el VEGF (Graupera et al., 2008). Aunque el número de estudios que asignan funciones específicas a cada uno de los miembros de PI3K de clase I va creciendo, en determinadas situaciones pueden complementarse entre sí. Por ejemplo, las células deficientes en actividad de p110 α y p110 δ , no muestran defectos en proliferación porque p110 β sustituye a éstas en la señalización mediada por determinadas citoquinas (Foukas et al., 2010). Esta activación de p110 β es independiente de GPCR, pues el tratamiento con Ptx no bloquea la fosforilación de Akt (Foukas et al., 2010).

Aunque se van conociendo mejor los mecanismos que regulan a p110 β , su función en el organismo todavía no está completamente definida. La deficiencia total de p110 β produce la muerte del embrión en estadio de blástula, lo que indujo a pensar que la actividad de p110 β era imprescindible para el desarrollo (Bi et al., 2002). Sin embargo, estudios mas recientes demuestran que p110 β tiene otras funciones importantes además de actuar como proteína quinasa. Ratones deficientes en la actividad lípido quinasa de p110 β completan el desarrollo embrionario (Ciraolo et al., 2008). Estos datos sugieren que p110 β podría jugar un papel importante como proteína adaptadora, que resultaría imprescindible para el desarrollo embrionario. Además, fibroblastos embrionarios deficientes p110 β recuperan la proliferación tanto si son reconstituidos con p110 β activa como con una forma inactiva de p110 β (Jia et al., 2008). En esta línea, p110 β interacciona con PCNA, promoviendo su unión a la cromatina durante la fase de síntesis de ADN del ciclo celular (Marques et al., 2009). La unión de PCNA es imprescindible para la replicación del material genético, lo que podría explicar la temprana mortalidad observada en el ratón deficiente en p110 β .

OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

- 1) Aislamiento y caracterización de un cultivo primario de progenitores neurales.
- 2) Estudio *in vitro* de la migración de NPC.
- 3) Análisis de las rutas de señalización implicadas en el movimiento de NPC.
- 4) Puesta a punto de un modelo murino para el estudio *in vivo* de la migración de NPC.
- 5) Evaluación del papel de PI3K β en el movimiento *in vivo* de NPC.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Anticuerpos.

Anticuerpos Primarios					
Anticuerpo (Anti-)	Monoclonal	Origen	Técnica	Dilución	Casa Comercial
Erk1		Conejo	WB	1:1000	Santa Cruz
Erk2		Conejo	WB	1:1000	
fosfo-Erk-1/2	X	Ratón	WB	1:1000	
Gαi		Conejo	WB	1:200	
p110β		Conejo	WB	1:1000	
p110α			WB	1:1000	Klipple
actina-β	X	Ratón	WB	1:3000	Sigma Aldrich
tubulina-β	X	Ratón	WB	1:3000	
tubulina-βIII	X	Ratón	IF	1:1000	
Laminina		Conejo	IF	1:500	
Akt		Conejo	WB	1:1000	Cell Signaling
fosfo (Thr 308)-Akt	X	Conejo	WB	1:1000	
Jak2	X	Conejo	WB	1:500	
Nestina		Conejo	IF	1:800	Covance
CXCL12		Conejo	IF	1:200	eBioscience
GFAP		Conejo	IF	1:400	Abcam
mCXCR4 (biotinilado)		Rata	FACS	1:200	BD Pharmingen
Mouse IgG2b (biotinilado)		Rata	FACS	1:200	
CD31		Rata	IF	1:100	
SMC3		Conejo	WB	1:1000	Chemicon international
CXCR4		Ratón	WB, IP	30 µg	Vila-Coro AJ 1999 FASEB J
Fibronectina		Conejo	IF	1:500	Affitiny BioReagents
fosfo-Tyr	X	Ratón	IP	2 µg	Promega

Tabla I. Relación de anticuerpos utilizados en diferentes técnicas empleadas durante la experimentación: Western blot (WB), inmunofluorescencia (IF), inmunoprecipitación (IP) y citometría de flujo (FACS).

Anticuerpos Primarios					
Anticuerpo (Anti-)	Monoclonal	Orígen	Técnica	Dilución	Casa Comercial
Mouse IgG-	Agarosa	Cabra	IP	30 μ L	Sigma Aldrich
Mouse IgM-	Agarosa	Cabra	IP	30 μ L	
Mouse-	HRP	Cabra	WB	1:2000	Dako Cytomation
Rabbit-	HRP	Cabra	WB	1:2000	
IgG mouse	Alexa 488	Cabra	IF	1:200	Molecular Probes
IgG rabbit	Cy3	Cabra	IF	1:400	
IgM mouse	Cy3	Cabra	IF	1:400	
goat	Cy3	Burro	IF	1:400	
Avidina	PE		FACS	1:100	beckton Dickinson

Tabla II. Relación de Anticuerpos secundarios empleados en distintas técnicas: Western blot (WB), inmunofluorescencia (IF), inmunoprecipitación (IP) y citometría de flujo (FACS).

3.2.- Aislamiento de Progenitores Neuronales y Cultivo de Neuroesferas.

Como fuente de NPC se utilizó tejido nervioso procedente de embriones de 14,5 días de gestación (E14,5). En todos los experimentos se utilizaron ratones en fondo C57BL/6, ya fueran de genotipo silvestre o modificados genéticamente (Rietze and Reynolds, 2006). Para el aislamiento de NPC se extrae el útero de la hembra gestante en condiciones higiénicas y se transfiere éste a una placa Petri con PBS estéril. A continuación, se abre la pared del útero exponiendo los sacos vitelinos que se transfieren a una nueva placa con PBS estéril donde se extraen los embriones. Se desecha el tronco de los embriones y se transfieren las cabezas a una nueva placa Petri con PBS estéril en la que se procede a su disección con ayuda de una lupa binocular (12x, Leica). Se retira la piel y la parte del cráneo que recubre el cerebro, exponiendo y extrayendo los hemisferios cerebrales. Se retira el **tálamo** (parte que une los dos hemisferios) y las meninges (que recubren las superficie del cerebro). Se recogen los hemisferios cerebrales en un tubo de fondo cónico que contiene PBS estéril. A continuación, se procede a la homogenización del tejido para obtener una suspensión celular. Se centrifugan las células (900 rpm, 5 min y 22 °C) y se resuspenden en medio completo (DMEM/F12 + Glutamax (GIBCO) suplementado con N2 supplement (GIBCO), heparina 4 μ g/ml (Sigma-Aldrich), D-glucosa 8 μ g/ml (Sigma), L-Gln 2 mM (Sigma), bFGF 20 ng/ml (Peprotech) y EGF 20 ng/mL (Peprotech)). Para eliminar los restos de tejido, el homogeneizado se filtra usando un tamiz de tamaño de poro de 45 μ m (cell strainer, Falcon). Las células vivas se contaron por el método de exclusión del colorante de azul de tripán y, a continuación, se pusieron en cultivo (37 °C, 5 % CO₂ y 95 % humedad) en medio completo (25 mL/placa) a una densidad de 5 · 10⁴ células/cm² en placa Petri (diámetro 140 mm, Nunc). En estas condiciones, las NPC proliferan en respuesta a EGF y FGF, formando pequeños clones adheridos a la placa. Estos clones terminan despegándose, continuando su crecimiento en suspensión como agregados celulares esféricos llamados neuroesferas.

3.3.- Mantenimiento de cultivos.

Cuando las neuroesferas alcanzan un tamaño suficientemente grande (aproximadamente

100 μm), se recogen en tubos y se centrifugan (600 rpm, 5 min y 22 °C). Las neuroesferas se resuspenden en 1 mL de PBS-EDTA 0,02% y se disgregan mecánicamente para obtener una suspensión celular. Se filtran con un tamiz (45 μm diámetro del poro), y se siembran a una densidad de $3 \cdot 10^5$ células/mL en 25 mL de medio completo y se cultivan (37 °C, 5 % CO_2 y 95 % humedad) hasta la formación de nuevas neuroesferas. Para todos los experimentos se utilizaron NPC derivados de neuroesferas de 6 a 10 días en cultivo. Los experimentos se realizaron con una suspensión de células individualizadas a partir de neuroesferas, obtenidas como se ha descrito anteriormente.

Cuando fue requerido, se utilizaron ratones C57BL/6 modificados genéticamente para la obtención de cultivos de neuroesferas. Se aislaron NPC a E14,5 de ratones deficientes en p110 δ (Cedidos por el Dr Bart Vanhaesebroeck, Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London, London, United Kingdom) (Okkenhaug et al., 2002), en p110 γ (Cedidos por la Dra. Ana Clara Carrera, CNB-CSIC, Madrid, España) (Sasaki et al., 2000), de ratones transgénicos para RFP (Jackson Laboratories) y de ratones transgénicos para GFP (Jackson Laboratories) (Okabe et al., 1997). También se aislaron NPC a E11,5 de ratones deficientes en Jak2, por resultar esta mutación letal a estadio E12-E13 (Parganas et al., 1998).

3.4.- Diferenciación de NPC.

Las NPC se mantienen en un estado indiferenciado en el medio de cultivo descrito. Sin embargo y debido a sus propiedades multipotentes, se puede inducir su diferenciación a células del SNC *in vitro* (Rietze and Reynolds, 2006). Para ello, las neuroesferas se disgregaron y las células se sembraron en placas de 24 pocillos ($5 \cdot 10^5$ células/pocillo) que contenían cubres pretapizados (1h y 37 °C) con una mezcla poli-L-lisina/laminina (20 $\mu\text{g/mL}$ en PBS, 1:1 (p/p), Sigma-Aldrich). Las células se cultivaron (37 °C, 5 % CO_2 y 95 % humedad) durante 6 días en medio de diferenciación (Neurobasal medium (Gibco) suplementado con B27 Supplement (Gibco), L-Glutamina 2 mM, y FBS 1%) renovando el medio cada 2 días. Pasado este tiempo, la diferenciación se evaluó por inmunofluorescencia utilizando Ab específicos de marcadores de distintos tipos celulares (Tabla I).

3.5.- Estudios de Migración por Videomicroscopía.

Se estudió la migración de NPC por videomicroscopía en superficies tapizadas con y sin CXCL12. Para estos experimentos se utilizaron cámaras termostatzadas FCS2 (Biotechs) acopladas a un microscopio confocal (Zeiss Axiovert LSM 510-META). Se tapizaron cubres de vidrio con fibronectina (20 $\mu\text{g/mL}$, en PBS, 1h y 37 °C) o laminina (20 $\mu\text{g/mL}$, en PBS, 1h y 37 °C). Después del tapizado, y tras un lavado con PBS, los cubres se incubaron con CXCL12 (CXCL12 100 nM, 1 h y 37 °C) seguido de un nuevo lavado. En la cámara de migración se inyectó medio de migración para videomicroscopía (RPMI sin rojo fenol suplementado con N2 supplement, heparina 4 $\mu\text{g/mL}$, bFGF 1 ng/mL y EGF 1 ng/mL) y se precalentó a 37 °C. Tras ello, se inyectaron en la cámara precalentada las NPC (0,5 mL y $1,5 \cdot 10^6$ células) en medio de migración, previamente marcadas con CFSE (10^7 células/mL en PBS, CFSE 1 μM , 12 min y 37 °C). Se dejaron sedimentar las células. Pasado este tiempo y tras elegir campo de visión

con número de células suficiente para el análisis, se comenzó la adquisición de imágenes cada 20 s durante 90 min. Se adquirieron imágenes de fluorescencia (sección confocal 10 μm) y de luz transmitida con amplificación 20x. Como fuente de excitación se empleó la línea de 488 nm de un láser de Ar. Las películas se analizaron con la herramienta de seguimiento de células individuales (single cell tracking) disponible en el programa de análisis de imagen científica Imaris 6.0 (Bitplane). El programa reconoce las células en el video en base a la fluorescencia, de manera que, en función de unos parámetros acotados por el investigador, es capaz de identificar la posición de una misma célula en cada uno de los fotogramas de la película. Esto permite dibujar la trayectoria seguida por cada célula y determinar así sus parámetros cinemáticos. El análisis estadístico de la población observada en la película así como los gráficos, fueron realizados con el programa informático Prism 5.0 (Graph Pad).

3.6.- Ensayo de Quimiotaxis.

Para estudiar la capacidad migratoria de NPC en respuesta a gradientes quimiotácticos, se realizaron ensayos de trans migración en cámaras de Boyden (Transwell, Costar) que poseen una membrana porosa (8.0 μm diámetro de poro) tapizada con fibronectina (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS, 16 h y 4 °C; Sigma) (Rodríguez-Frade et al., 2009).

NPC se disgregaron con PBS-EDTA 0,02 % y $3,5 \cdot 10^6$ células se marcaron con 500 μL de la sonda fluorescente CFSE (1 μM en PBS a 37 °C, 12 min; $\lambda_{\text{exc}} = 492 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 517 \text{ nm}$; Molecular Probes). Después del marcaje, las células se lavaron con medio de basal (DMEM/ F12 + Glutamax, N2 supplement, heparina 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, D-glucosa 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma), L-Gln 2 mM (Sigma)), seguido de centrifugación (1200 rpm, 5 min y 22 °C). Las células fueron resuspendidas a una densidad de 10^6 células/mL en medio de migración (medio basal suplementado con bFGF 1 ng/mL y EGF 1 ng/mL) y se depositaron en el compartimento superior de la cámara de Boyden ($1 \cdot 10^5$ células/pocillo) y se dejó transcurrir tiempo para que se produjera la migración (16h a 37 °C, 5 % CO_2 y 95 % humedad). Las células que no migraron (superficie superior de la membrana) se eliminaron rascando suavemente con un bastoncillo de algodón, mientras las células migradas se encuentran adheridas en la superficie inferior de la membrana. Tras fijar las células migradas con paraformaldehído al 4 % (en PBS pH 7,4, 12 min y 22 °C), se evaluó la fluorescencia por microscopía confocal (sección focal 25 μm , $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505\text{-}520 \text{ nm}$, Zeiss Axiovert LSM 510-META).

Proteína diana	Inhibidor	[Inh]/ μM	Disolvente	Ensayo Utilizado	Casa Comercial
Src	Src Inhibitor I	10	DMSO	CC, Quimio	Calbiochem
Jak2	Jak2 Inhibitor II	10	DMSO	CC, Quimio	Calbiochem
MEK 1/2	UO126	10	DMSO	CC, Quimio	Calbiochem
PI3K (genérico)	LY 294002	10	DMSO	CC, Quimio, WB	Calbiochem
CXCR4	AMD3100	10	Agua	CC, Quimio	Calbiochem
PI3K (p110 α)	PIK-75	0,01	DMSO	Quimio, WB	Caiman
PI3K (p110 β)	TGX-221	30	DMSO	Quimio,WB, Organo	Caiman
G α i	Pertussis toxin	0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Glicerol 50%	CC, Quimio	Sigma

Tabla III. Relación de Inhibidores utilizados en diferentes técnicas empleadas: ciclo celular (CC), ensayos de quimiotaxis (Quimio), ensayos de migración en cultivos organotípicos (Organo) y Western blot (WB).

La adquisición se realizó con el diafragma abierto y utilizando la herramienta “Tile” del programa informático del microscopio, que permite escanear toda la superficie del pocillo obteniéndose una única imagen. En dichas imágenes se cuantificó el área de fluorescencia con el programa imageJ 4.3. Previamente se comprobó la relación lineal entre la fluorescencia y el número de células, debido a que a estas densidades las células forman una monocapa. Los resultados se expresan como porcentaje de migración, comparando la fluorescencia de células migradas respecto la fluorescencia del número total de células antes de limpiar con el bastoncillo. Todas las condiciones se realizaron por triplicado.

Para estudiar el papel de distintas rutas de señalización en la migración promovida por CXCL12 en NPC, se utilizaron inhibidores químicos específicos de proteínas de distintas vías de señalización. Estos ensayos se realizaron en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, pero en presencia del inhibidor durante el experimento. En los tratamientos se utilizaron los inhibidores a las concentraciones indicadas en la Tabla V.

3.7.- Estimulación de NPC con CXCL12 y preparación de muestras para Western Blot.

Para el análisis bioquímico de la señalización mediada por CXCL12 en NPC, se trabajó con células derivadas de neuroesferas. Se recogieron las neuroesferas, se centrifugaron (600 rpm, 5 min y 22 °C) y se pusieron de nuevo en cultivo en medio basal (2h a 37 °C, 5 % CO₂ y 95 % humedad). Pasado este tiempo, las células se recogieron, centrifugaron (600 rpm, 5 min y 22 °C) y resuspendieron en PBS-EDTA 0,02 % para su disgregación mecánica. La suspensión celular se tamizó para eliminar neuroesferas sin disgregar. Tras lavar las células con PBS (1 vez) y centrifugar (1200 rpm, 5min y 22 °C), 5·10⁶ células en 1 mL de medio basal fueron estimuladas con CXCL12 (50 nM y 37 °C) a distintos tiempos. La reacción se paró añadiendo 1 mL de PBS frío, seguido de centrifugación (3000 rpm, 3 min y 4 °C). Tras un nuevo lavado con PBS frío y centrifugación (3000 rpm, 3 min y 4 °C), se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se congeló en hielo seco.

3.7.1.- Lisados celulares totales.

Las células se lisaron (30 min, 4 °C y agitación constante) en 0,1 mL de tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, desoxicolato sódico 0,25 % (Sigma-Aldrich), Igepal 1 % (Sigma-Aldrich), NaCl 150 mM y EDTA 1 mM) que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas (NaF 25 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 10 µg/mL, aprotinina 10 µg/mL, ortovanadato sódico 1 mM). Los extractos celulares se centrifugaron (1,5·10⁴ x g, 15 min y 4 °C) para eliminar los restos celulares. En el sobrenadante se valoró la cantidad de proteína por el método del ácido bicinonínico (BCA, Thermo Scientific).

3.7.2.- Inmunoprecipitación (IP).

10⁷ células se lisaron (30 min, 4 °C y agitación constante) en un tampón detergente (trietanolamina 20 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, EDTA 2 mM, glicerol 20%, digitonina 1%)

que contiene la mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa indicada anteriormente. Tras la lisis, las muestras se centrifugaron ($1,5 \cdot 10^4 \times g$, 15 min y $4^\circ C$). La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Bradford. Para realizar la inmunoprecipitación, 500 μg de proteína total se incubaron con 20 μg de anti-IgM-agarosa (para la IP de CXCR4) o anti-IgG-agarosa (en el caso de la IP de fosfo-tirosina) ambos de ratón (60 min, $4^\circ C$ y agitación constante) (Mellado et al., 1998). Las muestras se centrifugaron ($1,5 \cdot 10^4 \times g$, 1 min y $4^\circ C$), se recogieron los sobrenadantes y se incubaron (16 h, $4^\circ C$ y agitación constante) con 30 μg del Ab CXCR4.01 (para la IP de CXCR4, (Mellado et al., 1998)) o 2 μg de anti-fosfotirosina (en el caso de la IP de fosfo-tirosina). A continuación, se añadió a las muestras directamente 20 μg de la correspondiente anti-IgM-agarosa o anti-IgG-agarosa, ambos de ratón. Tras incubación (60 min, $4^\circ C$ y agitación constante), se centrifugó ($1,5 \cdot 10^4 \times g$, 1 min y $4^\circ C$) y se descartó el sobrenadante. Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 8,0) y se resuspendieron en tampón de Laemmli como paso previo a la separación electroforética.

3.7.3.- Obtención de extractos nucleares.

Para el estudio de la traslocación de proteínas al núcleo se procedió al fraccionamiento celular para separar la fracción citosólica de la nuclear de NPC estimuladas con CXCL12 50 nM. Para ello, los sedimentos celulares se resuspendieron e incubaron (10 min, $4^\circ C$ y agitación constante) con 100 μL del tampón A (Triton X-100 0,1 %, Hepes 10 mM pH 7,9, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, sacarosa 0,34 M y glicerol 10 %) más la mezcla de inhibidores indicada al describir la obtención de lisados celulares totales. En estas condiciones se produce la lisis de la membrana plasmática manteniéndose los núcleos intactos. A continuación, se centrifugó la fracción nuclear ($3,5 \cdot 10^3 \times g$, 5 min, $4^\circ C$) y los núcleos se lavaron 1 vez con el mismo volumen de tampón A (sin Triton X-100). Después, se procedió a la lisis del sedimento nuclear con 50 μL de un tampón RIPA modificado (Tris-HCl 20 mM pH 8, desoxicolato sódico 0,5 %, Igepal 1 %, SDS 0,1 %, NaCl 137 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM, glicerol 10 % y mezcla de inhibidores) incubando (30 min, $4^\circ C$ y agitación constante). Tras eliminar restos insolubles por centrifugación ($1,5 \cdot 10^4 \times g$, 15 min y $4^\circ C$) se obtuvieron los extractos nucleares. La cantidad de proteína se determinó por el método de BCA siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Cantidades iguales de proteína se diluyeron con tampón de Laemmli para su posterior separación electroforética.

3.7.4.- Separación electroforética y análisis por Western blot.

En todos los casos, las muestras eran diluidas con tampón de Laemmli y desnaturalizadas (5 min y $100^\circ C$) como paso previo a su separación electroforética. Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (8-12%, dependiendo de las proteínas a estudiar) en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS). Una vez separadas las proteínas por tamaño, se procedió a la transferencia del contenido del gel a membranas de nitrocelulosa. La homogeneidad de la carga proteica en las distintas muestras se confirmó por tinción con rojo Ponceau. Tras el lavado de la membrana con TBS, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon (1h y $22^\circ C$) con TBS-leche desnatada al 5% (para el análisis de proteínas no fosforiladas) o con TBS-BSA 5 % (para

el análisis de proteínas fosforiladas). Una vez bloqueadas las membranas se incubaron (16 h, 4 °C y agitación constante) con el Ab específico para la proteína a estudiar en TBS-leche 2,5 % o TBS-BSA 5 % (según el tipo de análisis a realizar). Tras la incubación con el Ab primario, se lavaron las membranas 3 veces con TBS-Tween 20 0,1 % seguido de 3 lavados con agua destilada. Las membranas se incubaron (45 min y 22 °C) con el Ab secundario, fusionado a la peroxidasa de rábano, que reconocía específicamente el Ab primario, disuelto en TBS-leche 2,5 % o TBS-BSA 5 % (según análisis). Para la detección final de la proteína de interés en la membrana, ésta se incubó con ECL (1 min y 22 °C; protein detection kit, Healthcare-GE). La señal luminiscente producida se detectó por exposición de película fotográfica (Konica Minolta) a la membrana de nitrocelulosa y posterior revelado de la película.

3.8.- Citometría de flujo.

3.8.1.- Marcaje de Proteínas Celulares.

El marcaje se realizó sobre una suspensión de células individuales a partir de neuroesferas disgregadas con PBS-EDTA 0,02 %, como se ha descrito en apartados anteriores. Se depositaron 10^5 células/pocillo de suspensión celular en placas de 96 pocillos con fondo en V. Las células se centrifugaron (1200 rpm, 5 min y 4 °C) y se resuspendieron e incubaron con la disolución del Ab primario (0,5 µg/pocillo, 30 min y 4 °C) en PBS-marcaje (PBS pH 7,0, FBS 0,1% y BSA 1%). Las células se lavaron dos veces con PBS-marcaje, se centrifugaron (1200 rpm, 5 min y 4 °C), resuspendieron e incubaron con el Ab secundario (15 min, 4 °C y oscuridad). Terminado el marcaje y tras lavar de nuevo las células con PBS-marcaje y resuspenderlas en 100 µL del mismo tampón, se analizó la fluorescencia unida a las células por citometría de flujo (Cytomics FC 500, Beckman Coulter) utilizando como fuente de excitación la línea de 488 nm de un láser de Ar. El análisis de los resultados se realizó con el programa Cytomics CXP (Beckman Coulter).

Los eventos se clasificaron por tamaño y complejidad en función de la dispersión producida por las células al pasar por el detector, lo que nos permitió diferenciar entre células viables y restos celulares. Normalmente, se adquirirían 10^4 eventos de la población de células vivas para obtener una muestra representativa de la población. El porcentaje de células positivas fue el resultado de la substracción de la fluorescencia de las células marcadas con el Ab control del mismo isotipo que el Ab específico.

3.8.2.- Ciclo Celular.

Para el estudio del ciclo celular se realizó tinción por incorporación de yoduro de propidio al ADN de las células. La cantidad de material genético depende de la fase del ciclo celular, con lo que las células muestran diferentes intensidades en la señal dependiendo del momento del ciclo en que se encuentren. Para ello, se cultivaron en medio de migración $5 \cdot 10^5$ células en presencia o ausencia de los mismos inhibidores que en los ensayos de trans migración (16h a 37 °C, 5 % CO₂ y 95 % humedad). Después del tratamiento, las células se recogieron en tubos de citómetro, se disgregaron con PBS-EDTA 0,02% y se centrifugaron (1200 rpm y 22 °C). Para el

marcaje de yoduro de propidio se utilizó el kit comercial (COULTER® DNA PREP™ Reagents Kit, Beckman Coulter) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El análisis del ciclo celular se realizó por citometría de flujo (Cytomics FC 500, Beckman Coulter) utilizando como fuente de excitación la línea de 488 nm de un láser de Ar.

3.9.- Nucleofección.

Para la introducción de plásmidos o ARN interferente (ARNi) utilizamos el método de nucleofección (Mouse NSC Nucleofector Kit, Amaxa Biosciences) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. En la preparación de las NPC para la nucleofección, las neuroesferas se recogieron y se centrifugaron (600 rpm, 5 min y 22 °C). A continuación, se resuspendieron y disgregaron con PBS-EDTA 0,02 %. Se filtró y la suspensión celular obtenida se centrifugaron (1200 rpm, 5 min y 22 °C). El sedimento celular se resuspendió en medio de nucleofección (nucleofector solution, suplementado según fabricante) a una densidad de $6 \cdot 10^7$ células/mL. A la suspensión celular se le añadió el ARNi ($2 \mu\text{g}/6 \cdot 10^6$ células) o ADN ($4 \mu\text{g}/6 \cdot 10^6$ células). La mezcla de células-ADN/ARN se repartió entonces en las cubetas de electroporación (100 μL /cubeta de nucleofección) y éstas se electroporaron con el programa A-33 del aparato de nucleofección. A continuación, las células se pusieron en cultivo (37 °C, 5 % CO_2 y 95 % humedad) con medio completo en placas de cultivo celular de 24 pocillos. Los posteriores experimentos se realizaron 48 h después de la nucleofección.

RNAi	Número	Secuencia	Casa Comercial
jak1	#1	gaa aau gaa uug agu cga u	Dharmacon
	#2	gaa auc acc cac auu gua a	
	#3	cgc aug agg uuc uac uuu a	
	#4	gca cag gga cag uau gau u	

Tabla IV. Relación de oligonucleótidos utilizados en el silenciamiento de la expresión de Jak1.

Plásmido	Proteína/shRNA	Casa Comercial
pEGFP-N3	GFP	BD Bioscience
pRS (Ref. TR515159)	shRNA p110	Origene
pRS (Ref. TR30012)	shRNA inespecífico	

Tabla V. Relación de plásmidos utilizados en los experimentos de nucleofección

3.10.- Modelo de Isquemia focal por foto-trombosis.

3.10.1.- Protocolo de inducción de isquemia.

El manejo de los animales de laboratorio, los procedimientos quirúrgicos y los cuidados postoperación se llevaron a cabo de acuerdo a la normativa de CNB y del comité de bioética animal del mismo centro. Como modelo de isquemia cerebral se utilizó el método de formación de isquemia focales por foto-trombosis (Lee et al., 2007; Schroeter et al., 2002). Este protocolo

presenta ciertas ventajas respecto a otros modelos de isquemias como cirugía sencilla, con posibilidad de modificar la localización de la lesión y con mucha reproducibilidad en cuanto a localización y tamaño de la lesión. Para la experimentación se utilizaron ratones hembras de la cepa C57BL/6 de 2 meses de edad. Se les inyectaron, vía intraperitoneal (i.p.), 0,1 mL de Rosa Bengala (10 mg/mL, en PBS) y se esperó 10 min mientras el compuesto se distribuía por el torrente sanguíneo. El ratón fue entonces anestesiado por inhalación con isoflurano 3 % con una cámara de anestesia y después colocado sobre una manta calefactora para mantener la temperatura corporal. Se le sujetó en el **cuadro estereotáxico** por los oídos con ayuda de las barras laterales y se redujo la anestesia a 1,5 % de isoflurano durante la operación. Se abrió una incisión sagital desde la altura de los ojos hasta las orejas con un bisturí, se retiró el periosteó que recubre el cráneo con un bastoncillo de algodón. Sobre el ratón inmovilizado se colocó una fuente de luz fría (fibra óptica, diámetro de la apertura 0,5 cm) muy cerca de la superficie del cráneo, entre **bregma** y **lambda** y a 1,75 mm hacia la derecha de la **sutura sagital**, es decir, sobre el hueso parietal derecho. A continuación, se iluminó (15 min, 3000 K y apertura C, Schott KL1500 LCD) para inducir la formación del trombo. Después, se suturó la herida para cerrar la incisión realizada en la cabeza y se colocó al ratón sobre una manta calefactora hasta su recuperación.

3.10.2.- Transplante intraparenquimal.

Como modelo de migración *in vivo* estudiamos el movimiento de NPC, transplantadas en las proximidades de la isquemia, hacia el área dañada. Se transplantaron 10^5 células en el hemisferio infartado de cada ratón, utilizando coordenadas estereotáxicas (Paxinos, 2001) 3 tres días después de la inducción de la lesión por foto-trombosis. Primeramente, se preparó una suspensión celular a partir de neuroesferas (según se explicó anteriormente), se filtró (diámetro de poro 45 μ m) y se trataron con DNasa I (1:1000, 5 min y 22 °C; Roche). $1,7 \cdot 10^6$ células vivas se centrifugaron en microcentrífuga (3000 rpm, 5 min y 4 °C) y se lavaron con medio basal. Las células se resuspendieron en 2 μ L de medio basal justo antes de cargar una pipeta de vidrio (diámetro 70 μ m), acoplada al cuadro estereotáxico, con la que se inyectaron las células en el ratón. Para ello, se anestesió al ratón por inhalación de isoflurano 3 % en una cámara de anestesia, y se colocó sobre una manta calefactora para mantener la temperatura corporal. Se sujetó al ratón en el cuadro estereotáxico y se bajó la anestesia a 1,5 % de isoflurano durante la operación. Se abrió una incisión sagital en la cabeza para descubrir el cráneo, se retiró el periosteó y comprobó el tamaño y localización de la lesión. Se colocó la punta de la pipeta sobre bregma (origen de coordenadas), se establecieron las coordenadas del punto de la inyección y se hizo una marca sobre el cráneo en dicho punto. Después, con un taladro de dentista, se practicó un pequeño orificio en el cráneo sobre la marca. Se volvió a colocar la pipeta en las coordenadas de interés y se introdujo en el parénquima cerebral. A un grupo de ratones se les practicó inyección contralateral (bregma -2,06 mm, -1 mm lateral, 1 mm profundidad) y a otro grupo, inyección ipsilateral (bregma -2,06 mm, 0,5 mm lateral, 1 mm profundidad). Se inyectaron aproximadamente 10^5 células en un volumen de 0,1 μ L, con ayuda de un microinyector, lentamente, para evitar que la presión produjese lesiones en el parénquima cerebral. Tras retirar la pipeta lentamente y desinfectar la zona, se cerró la herida con pegamento instantáneo. Se retiró al ratón del cuadro estereotáxico y se colocó sobre una

manta calefactora hasta su recuperación.

3.10.3.- Perfusión de animales.

Los animales se sacrificaron 3 días post-transplante con una dosis letal de ketamina/xilacina (Imalgene 500/ Xilagesic) y se procedió a la perfusión de los mismos. Una vez anestesiado el ratón, se abrió la caja torácica de éste para exponer el corazón y se hizo una pequeña incisión en la aurícula derecha, de manera que permitiese la salida de sangre. En el ventrículo izquierdo se introdujo una aguja conectada a una bomba peristáltica. Primero, se bombearon 20 mL de PBS (flujo 5 mL/min) para eliminar la sangre y, a continuación, se bombearon 25 mL de formalina 10 % (Sigma-Aldrich) en aquellos ratones cuyos cerebros iban destinados al análisis histológico por microscopía. Los cerebros destinados al análisis por citometría de flujo se procesaron tras el primer paso de perfusión con PBS.

3.10.4.- Procesamiento del cerebro para análisis histológico.

Una vez fijados, se extrajeron los cerebros y se incubaron con formalina 10 % (16 h, 4 °C y agitación constante) seguido de crio-protección con PBS-Sacarosa-30 % (16-24 h, 4 °C y agitación constante). A continuación, los cerebros se embebieron en OCT (Tissue-Tek-OCT, Sakura) y se congelaron en una mezcla de isopentano/hielo seco. Los cerebros se cortaron con un criostato (CM1900, Leica) en secciones coronales de 20 µm, para proceder a su análisis.

3.10.5.- Detección de NPC por citometría de flujo.

Una vez los cerebros fueron perfundidos con PBS, se lavaron con PBS frío. Se separaron los dos hemisferios cerebrales y se diseccionó la corteza cerebral recogiendo la zona con la isquemia y, como control, la misma región en el hemisferio contralateral. Habiendo separado ya las regiones de interés, el tejido se troceó con un bisturí para facilitar la digestión. Para la obtención del homogeneizado, se utilizó una adaptación del protocolo de extracción de NPC de ratón adulto (Rietze and Reynolds, 2006). El tejido troceado se incubó (30 min, 37 °C y agitación constante) con 1,5 mL de medio de digestión (PBS pH 7,4, HEPES 10 mM, Tripsina 0,025 %, EDTA 0,02 %, DNasa I 0,1 %) y se disgregó mecánicamente con pipeta. La suspensión se dejó en reposo para que los fragmentos de tejido sin disgregar sedimentaran. Al sobrenadante se le añadió 2 mL de medio de parada (DMEM/F12 + Glutamax suplementado con N2 supplement, heparina 4 µg/mL, EDTA 0,02 % y FBS 1 %). Al sedimento celular se le añadieron 500 µL de medio de digestión y se incubó de nuevo (30 min, 37 °C y agitación constante). Tras la adición de 500 µL de medio de parada, las dos fracciones del homogeneizado se juntaron, se filtraron (poro 45 µm) y se centrifugaron (1200 rpm, 10 min y 4 °C). El sedimento se resuspendió en 2 mL de PBS-marcaje (PBS pH 7,0, FBS 0,1%, BSA 1 % y EDTA 0,02 %). La muestra se analizó en su totalidad por citometría de flujo (epics XL-MCL, Coulter) utilizando flujo lento, y el filtro 505-520 nm, para detectar NPC-GFP⁺. Como control de viabilidad, en paralelo NPC-GFP⁺ se trataron en las mismas condiciones que el tejido.

3.11.- Inmunofluorescencia.

3.11.1.- De células.

NPC derivadas de neuroesferas ($5 \cdot 10^5$ células/pocillo) se sembraron en placas de 24 pocillos que contenían cubres tapizados con poli-L-Lisina ($50 \mu\text{g/mL}$, 1h y 37°C ; Sigma-Aldrich). Después, las células se fijaron con PFA 4 % (PBS pH 7,4, 10 min y 22°C) y se lavaron con tampón PBS-NaCl 150 mM. En el siguiente paso, las células se permeabilizaron (10 min y 22°C) con tampón PBS (Tritón X-100 0,02 % y NaCl 150 mM) y, a continuación, se incubaron (1h y 22°C) con tampón de bloqueo (PBS con BSA 1 %, suero de cabra 0,1 %, Tween-20 0,05%, NaCl 50 mM). Después, las células se incubaron (20 min, 22°C y oscuridad) con el Ab primario ($250 \mu\text{L/pocillo}$, en tampón de bloqueo), seguido de 6 lavados con tampón de bloqueo. A continuación, se incubó (20 min, 22°C y oscuridad) con el Ab secundario conjugado con una sonda fluorescente ($250 \mu\text{L/pocillo}$, en tampón de bloqueo). Los cubres se lavaron y se montaron sobre portas con medio de montaje Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc). Para la detección de la fluorescencia asociada se utilizó microscopía confocal (Zeiss Axiovert LSM 510-META).

3.11.2.- De Tejido.

Cortes coronales ($20 \mu\text{m}$ espesor) de cerebro de ratón se lavaron y se hidrataron con PBS para eliminar el OCT en el que estaba embebido el cerebro. Se permeabilizaron los cortes (15 min y 22°C) con PBS-Triton X-100 0,5 % seguido de una incubación con tampón de bloqueo para tejido (PBS, BSA 1 % y suero de cabra 10 %). Tras el bloqueo, las secciones se incubaron (2h, 22°C y oscuridad) con el Ab primario disuelto en tampón de bloqueo para tejido. Después, se realizaron 3 lavados con PBS (5 min, 22°C y oscuridad) y se incubaron (45 min, 22°C y oscuridad) con el Ab secundario disuelto en tampón de bloqueo. Tras lavar con PBS, se tiñieron (10 min, 22°C y oscuridad) con Hoechst 33258 (Molecular Probes) para marcar los núcleos. Las inmunofluorescencias se montaron con Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc) y se dejó en oscuridad hasta el endurecimiento de la resina. Para examinar las inmunofluorescencias se utilizó microscopía de fluorescencia (microscopio Leica DMI 6000B, cámara CCD R2).

3.12.- Cultivo Organotípico de Cerebro de Embrión de Ratón y Electroporación in vitro de la EGM.

Se extrajo el **telencéfalo** de embriones E13,5 y se embebieron en agarosa de bajo punto de fusión. A continuación, se realizaron cortes coronales de los cerebros de $200 \mu\text{m}$ de grosor y se colocaron sobre membranas de policarbonato para el cultivo de explantes (Millicell Organotypic Cell Culture; Millipore). Una vez adherido el explante a la membrana, se inyectó en la EGM la disolución que contiene el plasmido (vector de expresión de GFP basado en pCAGGS). Tras la electroporación de la EGM ($t=0$ h), los explantes se mantuvieron en cultivo (36 h a 37°C , 5 % CO_2 y 95 % humedad) con medio de cultivo con DMSO 0,6% (control) o TGX-221 ($60 \mu\text{M}$), cambiando el medio cada 24 h. Transcurrido el tiempo de migración, se

extrajeron los explantes de las membranas. A continuación, se realizó inmunofluorescencia utilizando un Ab anti-GFP. Tras la inmunofluorescencia, se montaron los portas con Mowiol-Dabco con Bisbenzamida (1:1000, Sigma). Finalmente, se realizó la observación de los cortes por microscopía de fluorescencia (microscopio Leica DMI 6000B, cámara CCD R2).

3.13.- Cuantificación y Análisis de Imágenes de Experimentos *in vivo*.

Las imágenes de microscopía de los experimentos *in vivo*, se cuantificaron con el programa photoshop CS4 (Adobe Acrobat). Para ello, las imágenes se ordenaron de manera que fueran consecutivas en distintas capas de un mismo documento de photoshop. A continuación, se alinearon en base a estructuras presentes en las imágenes.

3.13.1.- Isquemia.

El alineamiento se realizó en base a estructuras como **ventrículos** laterales, hipocampo, cuerpo caloso, línea media y cicatriz de la inyección de las células visibles en las imágenes. Tras el alineamiento, se estableció el sitio de la inyección como punto de origen en la cuantificación. Se colocó en el punto de origen una gradilla de círculos concéntricos de radios creciente (cada 100 μm). Las células se clasificaron en proximales (las células que se encuentran distribuidas más cerca de la lesión teniendo como referencia el punto de origen) y distales (las células que se encuentran distribuidas más alejadas de la lesión teniendo como referencia el punto de origen). Tras contar el número de células en cada uno de los compartimentos de la gradilla, se calculó los porcentajes de células en cada compartimento respecto del número total de células en la imagen. Una vez cuantificadas todas las imágenes, se calculó la media y el error estándar para cada compartimento del conjunto de imágenes de un mismo ratón. Por último, se calculó la media y el error estándar de cada compartimento de los distintos ratones que componían un mismo grupo.

3.13.2.- Cortes de embrión.

En el caso de los cortes de embrión, el alineamiento se hizo en base a la EGM, ventrículos, corteza cerebral y sitio de la electroporación (acúmulo de células GFP⁺). Se colocó una gradilla de círculos concéntricos de radio creciente cada 250 μm (desde radio 500 μm hasta 1750 μm). A continuación, se contaron las células en cada compartimento del cuadrante que enfoca hacia la corteza y se calcularon porcentajes de células en cada compartimento respecto del número total de células en ese cuadrante. Y finalmente, se calculó el porcentaje medio y error estándar de cada compartimento de todas las imágenes que se correspondían con un mismo tratamiento.

3.14.- Técnicas de Biología Molecular.

3.14.1.- Aislamiento de ARN total.

El aislamiento de ARN a partir de NPC se realizó de dos maneras diferentes en función del número disponible de células. En general, se utilizó la purificación de ARN por el método

del trizol (TriReagent, Sigma). En los experimentos de nucleofección, debido al bajo número de células obtenido, se empleó un kit comercial (RNeasy micro, Quiagen).

Las neuroesferas se recogieron y centrifugaron (600 rpm, 5 min y 22 °C) para posteriormente disgregarlas, filtrarlas y contarlas. El sedimento de NPC ($3 \cdot 10^6$ células) se resuspendió en 1 mL de TriReagent hasta la completa lisis del sedimento celular.

Para el aislamiento de ARN total a partir de tejido, se diseccionó la zona de interés y se pesó. A continuación, se añadió TriReagent (1 mL/ 0,1 g de tejido) y se homogeneizó con un homogenizador eléctrico. Para la extracción del ARN total a partir de la disolución del trireagent (ya sea de células o tejido) se siguió el protocolo recomendado por el fabricante.

Técnica	Gen	Sentido	Secuencia	Tm/ ° C	Amplicón/pb	Referencia	
Q-PCR	GAPDH	5′	ccc atc acc atc ttc cag ga	60	70-100		
		3′	cga cat act cag cac cgg c				
	actina-β (ratón)	5′	ggc acc aca cct tct aca atg	60	70-100		
		3′	tgg atg gct acg tac atg gct				
	28S	5′	tgc cat ggt aat cct gct ca	60	70-100		
		3′	cct cag cca agc aca tac acc				
	CXCL12 (ratón)	5′	agc caa cgt caa gca tct ga	60	70-100		
		3′	tcg ggt caa tgc aca ctt gt				
	CXCR4 (ratón)	5′	cca tgg aac cga tca gtg tg	60	70-100		
		3′	ttt tca tcc cgg aag cag g				
	Jak1	5′	tga gct ttg atc gga tcc tt	60	70-100	Lange C 2010	
		3′	gca ggg tcc cag aat aga tat g				
	Jak2	5′	cgc ctg tgt atc ata ata tgt ttg cg	68,4	250		
		3′	aaa tca tgc cgc cac tga gc	69,6			
	Jak3	5′	cac agt gca tgg cct atg at	60	70-100	Lange C 2010	
		3′	agg tgt ggg gtc tga gag g				
	PIK3CA	5′	gct gga ttc agt tac tcc cat ac	60	70-100	Roche	
		3′	cgg agc tgt tcc ttg tca tt				
	PIK3CB	5′	tca gca tat ggg ttc gtc tg	60	70-100		
		3′	gct ggt ctt cgt ttc ctg at				
	PIK3CD	5′	ccc gct gat gcc aaa gta	60	70-100		
		3′	tgt tgt gtt act tct ctg agg tct g				
	PIK3CG	5′	cca gac agt gtt ttt gta aga gga	60	70-100		
		3′	tcc atg ccc tat gcg act				
PCR	Jak2 Fw	5′	tgc cag gtg gac gtg ttt aaa t	67,2	300		Parganas E 1998
	Jak2 Rev	3′	agg cat gca ata ccg agt gtt g	68			
	Neo Fw	5′	atc tcc tgt cat ctc acc ttg	60,7	700		

Tabla VI. Relación de oligonucleótidos utilizados para PCR. Los oligonucleótidos Jak2 Fw, Jak2 Rev y Neo Fw se utilizaron en el genotipado de los ratones Jak2 KO.

3.14.2.- Síntesis de ADN complementario.

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) se utilizó el método de la retrotranscriptasa, que sintetiza ADN a partir de una hebra de ARN. Para la síntesis del ADNc, se utilizó la misma cantidad de ARN total de las distintas muestras de un mismo experimento (entre 0,250 y 1 µg de ARN) y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante (Super Script First strand DNA synthesis, Invitrogen). Como control de pureza del ARN total, se

llevó en paralelo un control negativo de la síntesis de ADNc de las mismas muestras, pero sin retrotranscriptasa, y se comprobó la ausencia de contaminación con ADN genómico por PCR convencional.

3.14.3.- Q-PCR.

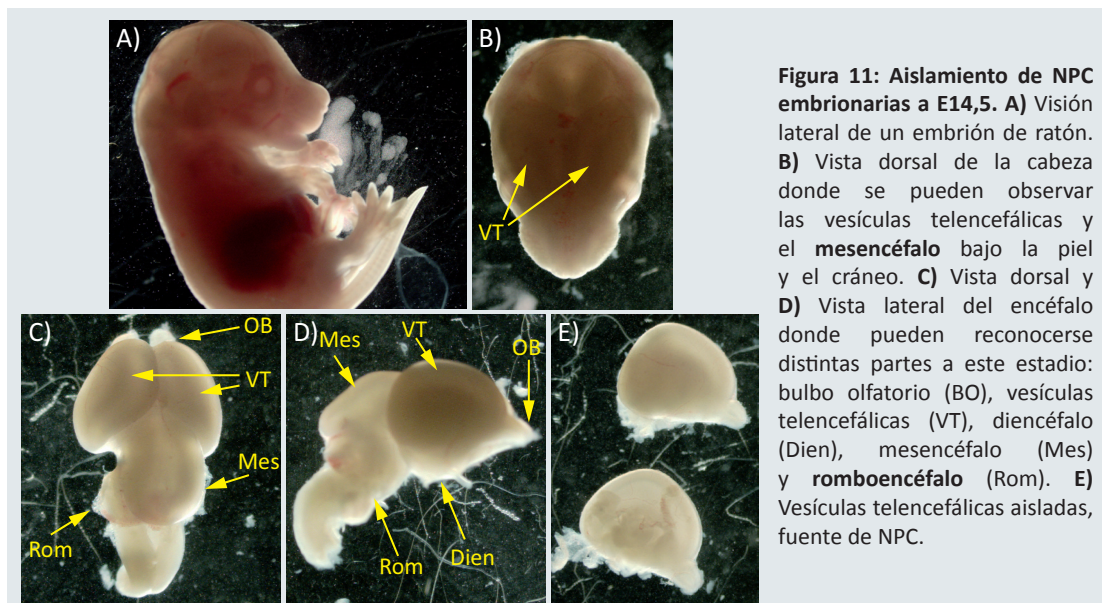
Las PCR cuantitativas y semicuantitativas se realizaron utilizando como método de detección de amplificación la sonda el SYBR-green. Estos experimentos se realizaron con un kit comercial según las recomendaciones del fabricante (Power SYBR Green PCR Master mix (2x), Applied Biosystems). Todas las reacciones se realizaron en un termociclador a tiempo real (7900 Real-Time PCR System; Applied Biosystems) en las siguientes condiciones: paso 1 (95°C y 10 min) y paso 2 (95°C, 15 s seguido de 60°C, 1 min; 40 ciclos). Los resultados se expresaron como “veces de inducción” (RQ) calculando la diferencia de ciclos entre distintos tratamientos de muestras ya normalizadas ($\Delta\Delta Ct$). Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en Q-PCR se encuentran en la tabla III.

RESULTADOS

4.1.- Aislamiento de NPC y Cultivo de Neuroesferas

4.1.1.- Aislamiento de NPC.

Para el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la migración en NPC fue necesario disponer de una fuente de células que crecieran en cultivo. Para ello, utilizamos cultivos de neuroesferas, agregados esféricos de NPC, que proliferan en cultivo manteniendo las mismas características progenitoras durante varias semanas.

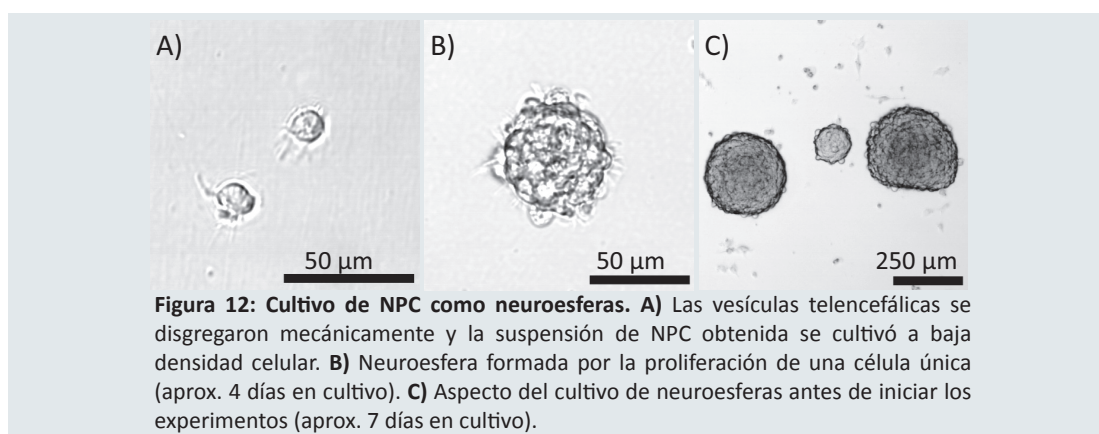


Para el inicio del cultivo de neuroesferas, se partió de NPC aisladas directamente de ratón. Estos precursores pueden ser de origen fetal o de ratón adulto, dando lugar a cultivos con características similares. En el ratón adulto, la neurogénesis se encuentra restringida a zonas concretas (ZV-ZSV y ZSG) del cerebro, siendo su disección más tediosa que en el caso del embrión. Además, el rendimiento de neuroesferas es inferior cuando se trata de tejido adulto, debido tanto al menor número de NPC como a su menor tasa proliferativa en comparación con las de origen embrionario. Por estas razones, en este trabajo sólo se utilizaron NPC de origen embrionario aisladas en aquellos estadios donde el pico de neurogénesis es

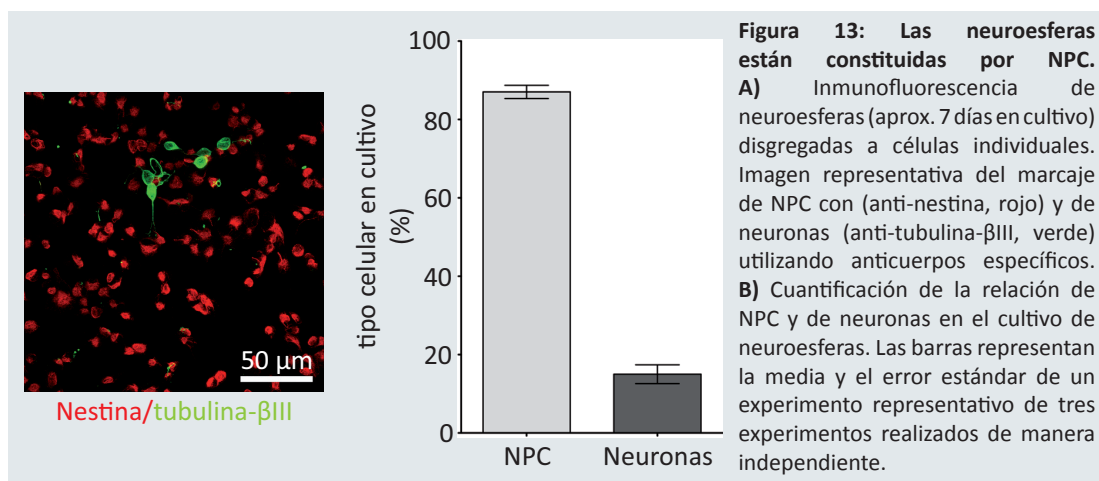
máximo (aproximadamente entre E11,5 y E16,5). Aislamos entonces NPC de las **vesículas telencefálicas** de embriones E14,5 (Fig. 11A y B) de ratones C57BL/6. Para ello, se extrajo el encéfalo (Fig. 11C y D), se separaron las vesículas telencefálicas del resto (Fig. 11E) y se procedió a su disgregación mecánica obteniendo una suspensión celular que contiene una mezcla de NPC y células diferenciadas.

4.1.2.- Crecimiento en cultivo de NPC como neuroesferas y su caracterización.

Las células se cultivaron con un medio selectivo y a baja densidad celular (Fig. 12A). El medio utilizado en el cultivo de NPC es un medio sin suero y con EGF y FGF como factores mitogénicos. En estas condiciones, las células diferenciadas mueren mientras que las NPC proliferan formando pequeños agregados adheridos a la placa (Fig. 12B) que, cuando alcanzan un tamaño suficientemente grande, se despegan continuando su crecimiento en suspensión y que se denominan neuroesferas (Fig. 12C).

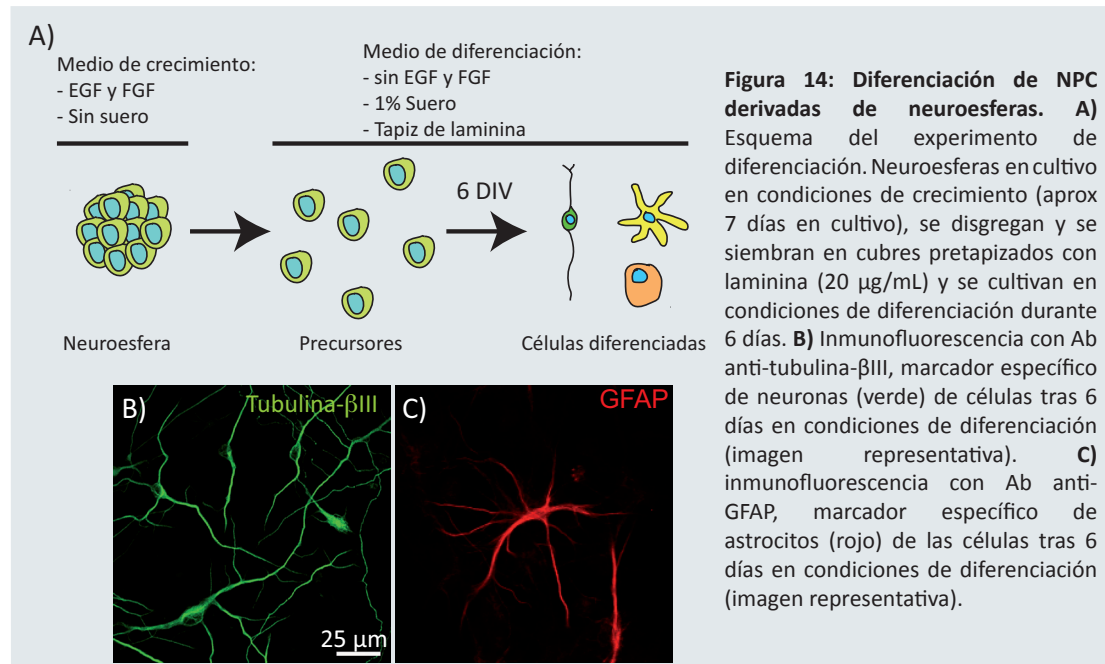


El uso de este medio de cultivo, hace que la composición de las neuroesferas sea mayoritariamente de células indiferenciadas y con capacidad de auto-renovación, lo que permite que estos cultivos se puedan expandir durante varios pases sin que cambien sus características. Sin embargo, para evitar alteraciones moleculares que pudieran producirse por el mantenimiento prolongado *in vitro* y que pudieran afectar a la reproducibilidad de los resultados obtenidos, decidimos utilizar siempre cultivos de NPC de entre 6 y 10 días en cultivo.



En primer lugar, comprobamos que nuestro cultivo de neuroesferas contenía mayoritariamente células indiferenciadas. Y, en segundo lugar, que las células fuesen multipotentes, pudiendo diferenciarse a células de distinto linaje. Para ello, se analizó por co-inmunofluorescencia la expresión de distintas proteínas que sirven de marcadores específicos para ciertos tipos celulares de origen nervioso. Como marcador de NPC se utilizó nestina, que es una proteína del citoesqueleto perteneciente al grupo de los filamentos intermedios. Nestina también se expresa en otros tipos celulares como células de las criptas del intestino delgado (Zhu et al., 2009), en astrocitos (Eddleston and Mucke, 1993; Pekny and Nilsson, 2005), bajo condiciones inflamatorias, y en células endoteliales (Sugawara et al., 2002) durante procesos angiogénicos.

Así observamos que en neuroesferas el ($86,7 \pm 1,8$)% de las células eran NPC (Fig. 13) y sólo un ($15,1 \pm 2,4$)% neuronas, como denota el marcaje con un Ab anti tubulina- β III, isoforma específica de neuronas (Fig. 13). En ningún caso se encontraron células que expresasen GFAP (del inglés “glial fibrillary acidic protein”), proteína del grupo de los filamentos intermedios expresada en astrocitos maduros (datos no mostrados).

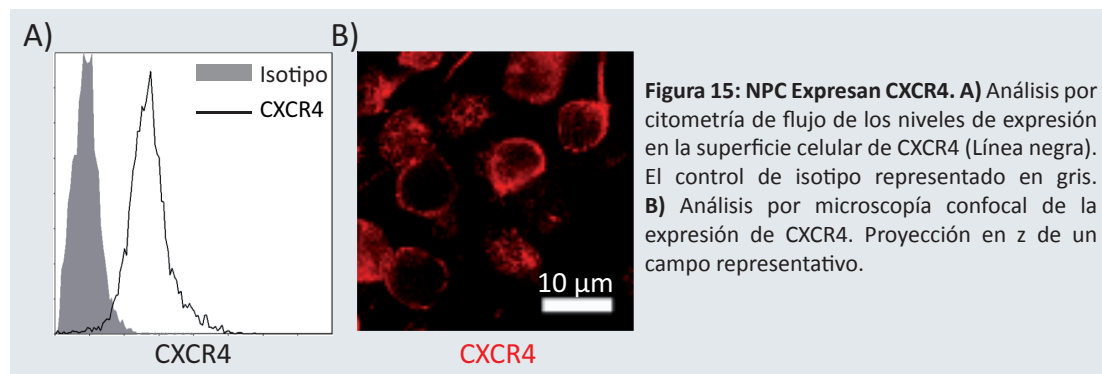


Para evaluar la **multipotencia**, NPC derivadas de neuroesferas se cultivaron en condiciones de diferenciación durante 6 días (Fig. 14A). Tras este periodo, se evaluó la multipotencia por inmunofluorescencia utilizando diferentes marcadores celulares. En estas condiciones, el marcaje con la isoforma tubulina- β III muestra un aumento del número de neuronas presentes en cultivo, así como el tamaño y complejidad de sus neuritas (Fig. 14B). Además de diferenciarse a neuronas, las NPC pueden diferenciarse a células de linaje glial como astrocitos, detectados por inmunofluorescencia con Ab específicos para GFAP (Fig. 14C).

Estos datos corroboran que en nuestras condiciones de cultivos, las neuroesferas están constituidas mayoritariamente por NPC, y que estas células son multipotentes.

4.2.- Estudio de la Motilidad de NPC

Debido al consenso sobre el papel que juega la quimioquina CXCL12 en la regulación de la migración de algunas poblaciones neuronales durante el desarrollo embrionario (Klein et al., 2001; Li et al., 2008; Lopez-Bendito et al., 2008; Lu et al., 2002; Lysko et al., 2011; Sanchez-Alcaniz et al., 2011; Stumm et al., 2003; Tiveron et al., 2006; Wang et al., 2011), así como en situaciones inflamatorias en el organismo adulto (Imitola et al., 2004; Robin et al., 2006; Thored et al., 2006), decidimos utilizar la migración a CXCL12 como modelo migratorio, *in vitro*, de NPC.



En este sentido, utilizando citometría de flujo e inmunofluorescencia con Ab específicos, se confirmó que las NPC derivadas de neuroesferas expresan CXCR4, uno de los receptores de CXCL12 (Fig 15).

Para estudiar la motilidad de las NPC en respuesta a CXCL12 *in vitro*, se utilizaron dos técnicas distintas: ensayos de migración en tiempo real analizados por videomicroscopía y ensayos de quimiotaxis en cámara de Boyden.

4.2.1.- Elección del medio de migración.

Para poder atribuir el efecto sobre la motilidad de las células al quimioatrayente ensayado, pensamos que sería conveniente la retirada de los factores de crecimiento EGF y FGF presentes en el medio, ya que podrían interferir en la respuesta a CXCL12. Sin embargo,

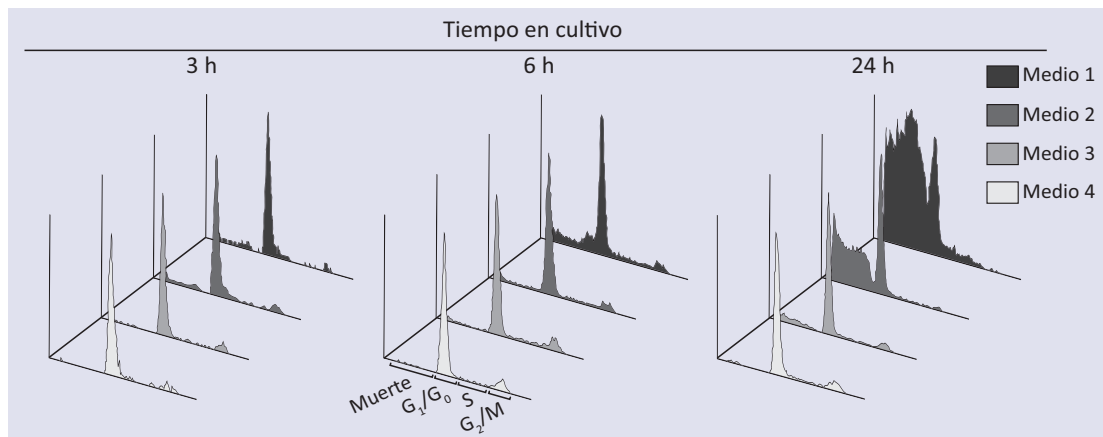


Figura 16: Elección del medio de migración. Se muestra el análisis del ciclo celular, por citometría de flujo, de NPC cultivadas en medios de distinta composición (medios 1-4) y a distintos tiempos de incubación: 3 h (panel de la izquierda), 6 h (panel del centro) y 24 h (panel de la derecha). La composición de los medios es: medio 1 (DMEM/F12 suplementado con BSA 1%, HEPES 25 mM), medio 2 (DMEM/F12 suplementado con N2, D-glucosa 8,6 mg/mL y L-Gln 2 mM), medio 3 (medio 2 suplementado con EGF 1 ng/mL y FGF 1 ng/mL) y medio 4 (medio 2 suplementado con EGF 20 ng/mL y FGF 20 ng/mL). Las distintas fases del ciclo celular representadas son: muerte, fase de crecimiento 1 y quiescencia (G_1/G_0), fase de síntesis de ADN (S) y fase de crecimiento 2 y mitosis (G_2/M).

estos factores son importantes para la supervivencia de NPC, por lo que su retirada podría afectar a la viabilidad de las células y, por tanto, a su capacidad de respuesta a CXCL12.

Primero, se realizaron ensayos de ciclo celular de NPC cultivadas en medios de distinta composición y a distintos tiempos de incubación (Fig 16). Se ensayaron cuatro medios diferentes: medio 1, DMEM/F12 (Suplementado con BSA 1%, HEPES 25 mM); medio 2, medio basal (DMEM/F12 suplementado con N2, D-glucosa 8,6 mg/mL y L-Gln 2 mM); medio 3, medio basal (con EGF 1 ng/mL y FGF 1 ng/mL) y medio 4, medio basal (con EGF 20 ng/mL y FGF 20 ng/mL). Tras los distintos tiempos de incubación, analizamos el estado del ciclo celular por citometría de flujo. Tras 3 h en cultivo, el ciclo celular de NPC no mostraba alteraciones importantes con ninguno de los medios empleados, detectándose únicamente un pequeño aumento de mortalidad con los medios 1 y 2 (Fig 16 panel izquierda). Tras 6 h de cultivo, se siguen observando NPC en todas las fases del ciclo celular, con un aumento apreciable de la mortalidad en el caso de las NPC cultivadas con el medio 1 (Fig 16 panel centro). Tras 24 h, la viabilidad de NPC en los medios 1 y 2 está seriamente comprometida, por lo que descartamos la utilización de estos medios para la realización de los ensayos de migración (Fig 16 panel

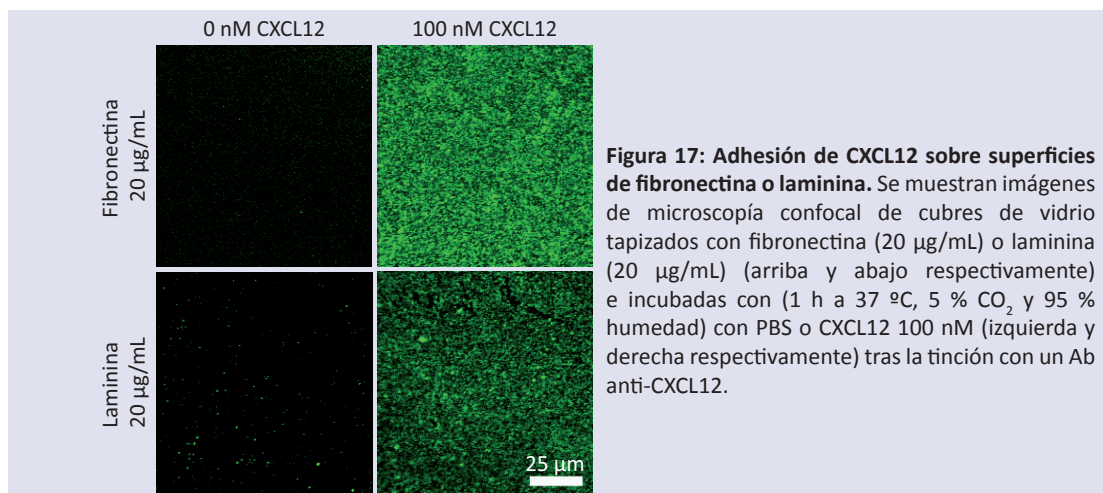


Figura 17: Adhesión de CXCL12 sobre superficies de fibronectina o laminina. Se muestran imágenes de microscopía confocal de cubres de vidrio tapizados con fibronectina (20 µg/mL) o laminina (20 µg/mL) (arriba y abajo respectivamente) e incubadas con (1 h a 37 °C, 5 % CO_2 y 95 % humedad) con PBS o CXCL12 100 nM (izquierda y derecha respectivamente) tras la tinción con un Ab anti-CXCL12.

derecho). Por otro lado, observamos que los factores de crecimiento son importantes para la supervivencia de NPC y que cantidades muy reducidas de factores de crecimiento, hasta 20 veces inferiores a las empleadas en el cultivo de neuroesferas (medio 3), son suficientes para mantener una buena viabilidad celular incluso tras 24 h de incubación (Fig 16 panel derecho). Por ello, se seleccionaron los medios 3 y 4 para la realización de los ensayos de migración *in vitro*.

4.2.2.- Ensayos de migración en tiempo real: Videomicroscopía.

Empleando cámaras termostatzadas acopladas a un microscopio confocal, realizamos experimentos de videomicroscopía. Esta técnica aporta información adicional respecto a los ensayos de transmigración como, por ejemplo, la posibilidad de estudiar parámetros cinemáticos en tiempo real y analizar los cambios morfológicos ocurridos en las células durante la migración. Además, en los ensayos de videomicroscopía, la quimioquina se encuentra adherida al sustrato haciendo el encuentro célula-quimioatrayente de forma similar a como se produce en el organismo. Una desventaja, sin embargo, es que no permite la formación de gradientes quimioatrayentes, por lo que el movimiento celular es al azar.

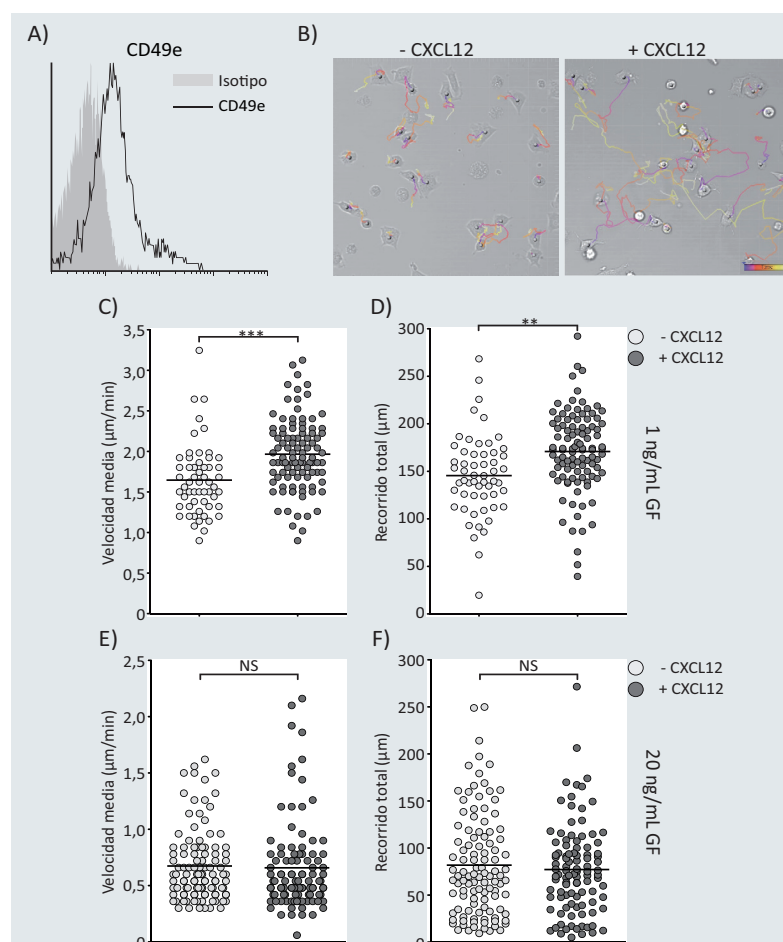
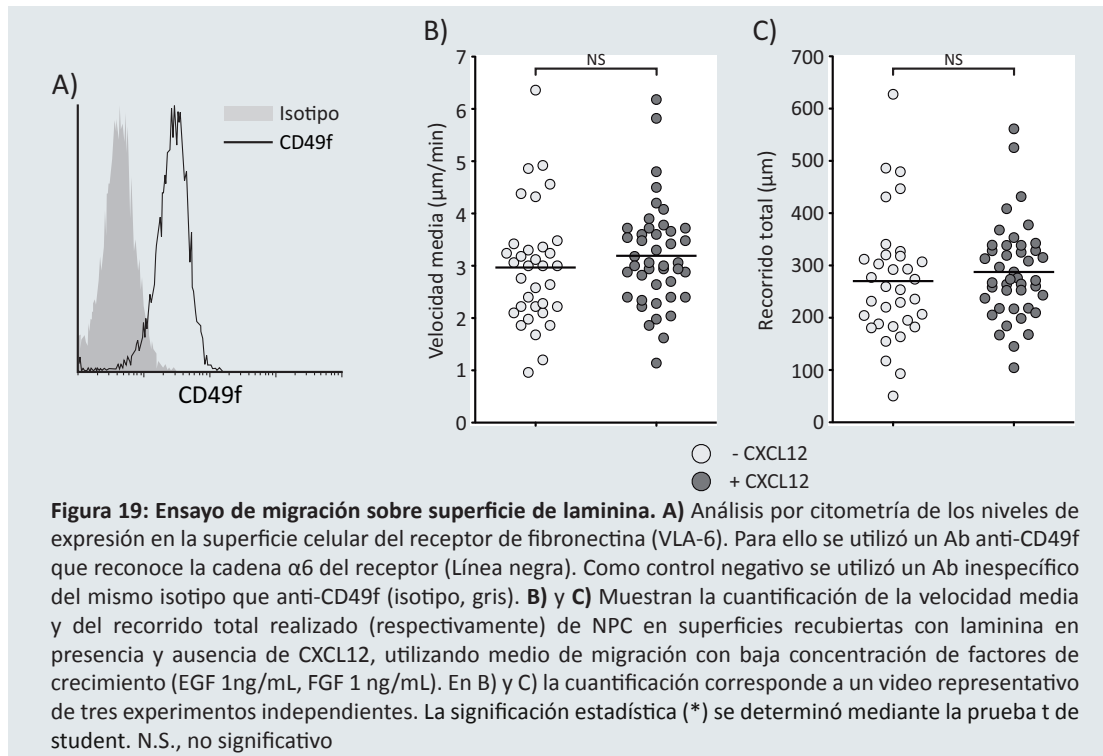


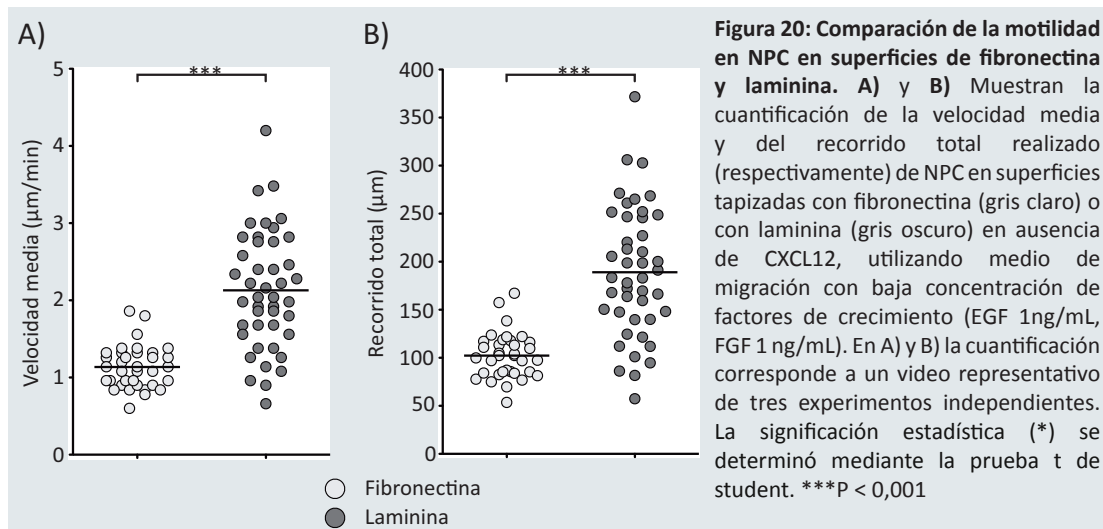
Figura 18: Ensayo de migración sobre superficie de fibronectina. **A)** Análisis por citometría de los niveles de expresión en la superficie celular del receptor de fibronectina (VLA-5). Para ello se utilizó un Ab anti-CD49e que reconoce la cadena $\alpha 5$ del receptor (Línea negra). Como control negativo se utilizó un Ab inespecífico del mismo isotipo que anti-CD49e (isotipo, gris). **B)** Se muestran imágenes representativas de la posición inicial de las células en los videos en ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) de CXCL12. Las líneas representan los recorridos realizados por cada una de las células a lo largo del video. La escala de tiempo está representada por el degradado de color que va del morado (tiempo inicial) al blanco (tiempo final). **C)** y **D)** Muestran la cuantificación de la velocidad media y del recorrido total (respectivamente) realizado por NPC en superficies recubiertas con fibronectina

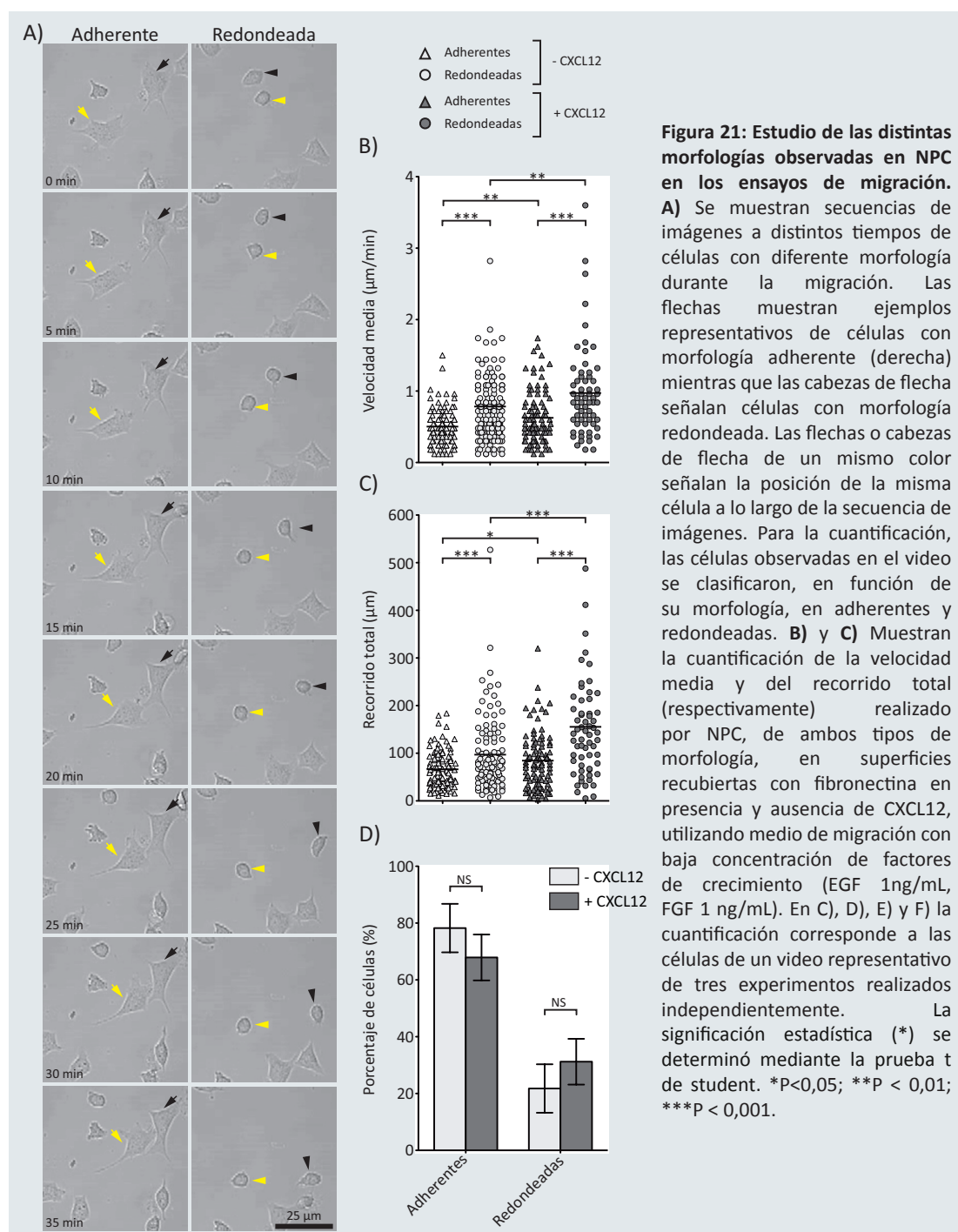
en presencia y ausencia de CXCL12, utilizando medio de migración con baja concentración de factores de crecimiento (EGF 1 ng/mL, FGF 1 ng/mL). **E)** y **F)** Muestran la cuantificación de la velocidad media y del recorrido total (respectivamente) realizado por NPC en superficies recubiertas con fibronectina en presencia y ausencia de CXCL12, utilizando medio de migración con alta concentración de factores de crecimiento (EGF 20 ng/mL, FGF 20 ng/mL). En C), D), E) y F) la cuantificación corresponde a las células de un video representativo de tres experimentos realizados independientemente. La significación estadística (*) se determinó mediante la prueba t de student. N.S., no significativo; **P < 0,01; ***P < 0,001.



Para el estudio de la motilidad de NPC por videomicroscopía, se utilizaron fibronectina y laminina como proteínas de matriz extracelular. Por inmunofluorescencia, comprobamos la adherencia de CXCL12 sobre ambas superficies. Tapizamos cubres con fibronectina (20 μg/mL) o laminina (20 μg/mL) seguido de una posterior incubación con CXCL12 (100 nM). Y comprobamos, mediante inmunofluorescencia, que la superficie estaba homogéneamente tapizada de CXCL12, independientemente de que la proteína de matriz extracelular fuese fibronectina o laminina (Fig. 17 arriba y abajo respectivamente).

En un primer lugar, estudiamos la respuesta de las NPC a CXCL12, utilizando como matriz extracelular fibronectina. El marcaje con anticuerpos específicos para el receptor de fibronectina (integrina $\beta_1\alpha_5$ o VLA-5) y posterior análisis por citometría de flujo, mostró que las NPC expresaban dicho receptor y son, por tanto, susceptibles de interaccionar con esta proteína de matriz extracelular (Fig. 18A). A continuación, se filmaron videos de NPC sobre



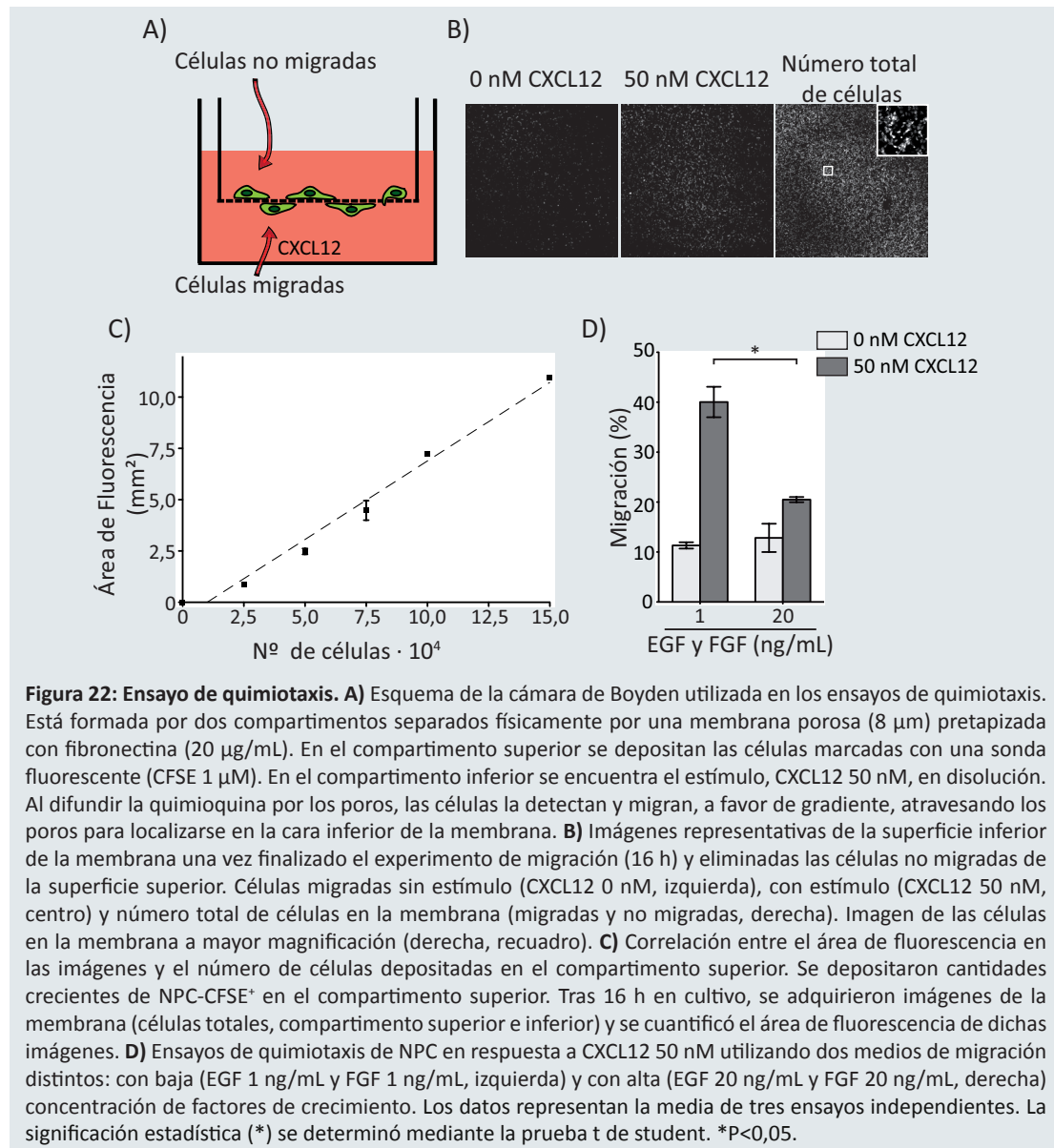


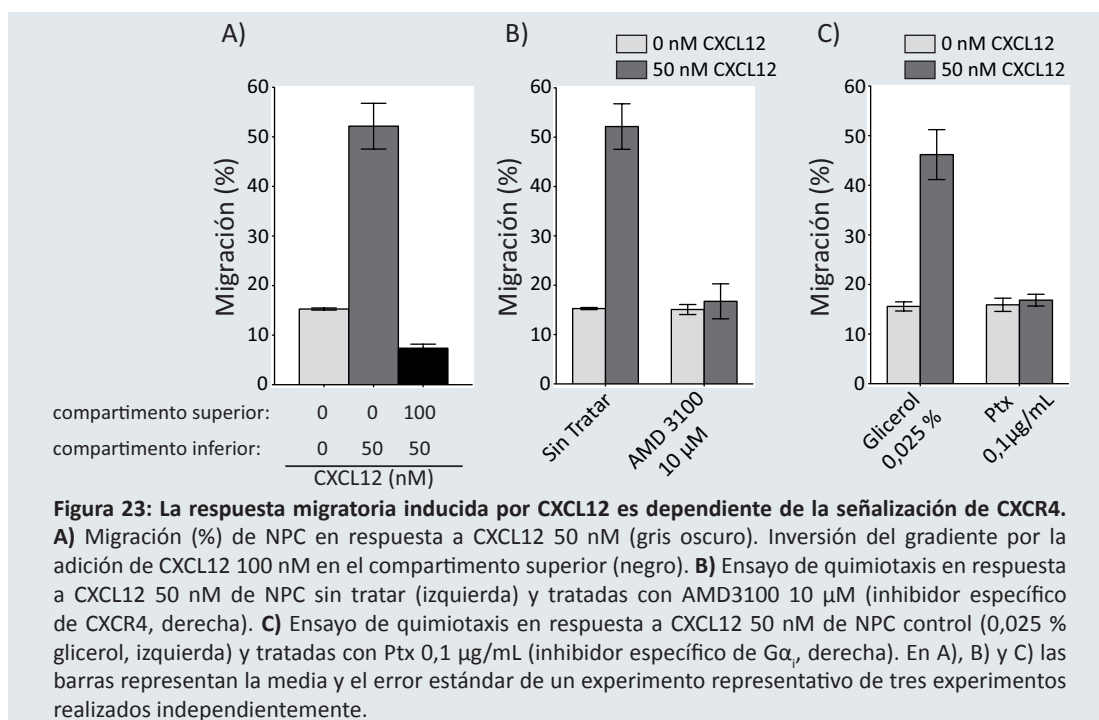
fibronectina, en presencia o ausencia de CXCL12 (Películas 2 y 3, respectivamente, Anexo I) adherida a la superficie durante un tiempo de 1h 30 min a 37 °C. En la figura 18B se puede observar un ejemplo representativo de los videos ya analizados donde se observa el recorrido realizado por las células. El examen de los videos determinó que las NPC presentaban motilidad basal en ausencia de CXCL12, pero que en su presencia, realizaban recorridos de mayor longitud utilizando el medio 3 (1 ng/mL EGF y FGF) como medio de migración (Fig. 18B). El análisis posterior mostró que CXCL12 induce un aumento significativo de la velocidad media de las NPC ($1,645 \pm 0,058 \mu\text{m/min}$ vs $1,964 \pm 0,044 \mu\text{m/min}$) (Fig. 18C) y, como consecuencia, se mueven distancias más largas ($145,5 \pm 5,7 \mu\text{m}$ vs $170,9 \pm 4,2 \mu\text{m/min}$) (Fig. 18D). Por otro lado, al analizar los videos realizados con el medio 4 (20 ng/mL EGF y FGF) observamos que, una elevada concentración de factores de crecimiento interfiere con la migración promovida

por CXCL12 (Fig. 18 E y F).

A continuación, se realizaron el mismo tipo de experimentos, pero utilizando cubres tapizados con laminina (20 $\mu\text{g/mL}$), en presencia o en ausencia de CXCL12. El marcaje previo con anticuerpos específicos demostró que las NPC expresaban el receptor de laminina (integrina $\beta_1\alpha_5$ o VLA-6) (Fig 19A). A diferencia de los experimentos sobre fibronectina, no se observaron diferencias significativas ni en la velocidad media ($2,966 \pm 0,195 \mu\text{m/min}$ vs $3,191 \pm 0,151 \mu\text{m/min}$) ni en el recorrido total ($270,1 \pm 20,5 \mu\text{m}$ vs $287,5 \pm 13,8 \mu\text{m}$) al comparar el movimiento de NPC en ausencia o en presencia de CXCL12 (Fig 19B y C, respectivamente).

Al comparar la migración de NPC en laminina respecto fibronectina, observamos que la laminina, por sí sola, estimulaba la motilidad en ausencia de CXCL12 de NPC incrementando su velocidad media significativamente respecto a fibronectina ($1,137 \pm 0,047 \mu\text{m/min}$ vs $2,130 \pm 0,115 \mu\text{m/min}$, respectivamente) (Fig 20A). Como consecuencia del aumento en la velocidad media, también aumenta la longitud del recorrido realizado por NPC ($102,3 \pm 4,0 \mu\text{m}$ vs $189,0 \pm 10,2 \mu\text{m}$, respectivamente) (Fig 20B). De hecho, no observamos ningún efecto promovido





por CXCL12. Es posible que el efecto estimulador del movimiento basal que tiene la laminina enmascare el efecto de CXCL12 sobre la motilidad celular.

Como información adicional de estos experimentos de videomicroscopía, detectamos dos poblaciones celulares con comportamiento o fenotipo distinto. Uno, muy adherente, en el que las células emiten protrusiones de membrana en varias direcciones antes de elegir la dirección a seguir (es frecuente observar cambios en la posición del frente de avance), recordando más al movimiento de tipo fibroblástico o mesenquimal (Fig. 21A; Película 4, Anexo I). Otro, menos adhesivo, con menos cambios de forma, que mantiene siempre el mismo frente de avance y que el cambio de dirección implica un giro completo de la célula (Fig. 21A; Película 5, Anexo I). Además, en el frente de avance se puede observar formación de **filopodios** con una actividad muy dinámica. Este fenotipo presenta una morfología más redondeada, dando la sensación de que su adhesión al substrato es menos firme y, por tanto, presenta mayor velocidad media que las adherentes tanto en ausencia como en presencia de CXCL12 (Fig. 21B) y también mayor recorrido total (Fig. 21C). En los análisis realizados se observó, sin embargo, que ambas poblaciones responden a CXCL12, aunque el efecto es mayor en el fenotipo menos adherente (Fig. 21B y C). Tampoco se apreció efecto alguno de la quimioquina induciendo cambio de un fenotipo a otro (Fig. 21D). Es más, parece que la proporción de los distintos fenotipos muestra cierta variabilidad entre los experimentos, resaltando la posibilidad de que se trate de características del cultivo, consecuencia de la heterogeneidad intrínseca de las neuroesferas.

4.2.3.- Ensayos de migración en cámara de Boyden: Quimiotaxis.

Para estudiar de modo rápido los efectos que tenía el bloqueo de distintas rutas señalizadoras sobre el movimiento celular de NPC, empleamos ensayos de quimiotaxis en cámaras de Boyden (Imitola et al., 2004).

Los ensayos de trans migración (Fig. 22A) se realizaron tapizando la membrana porosa con fibronectina (20 $\mu\text{g/mL}$) ya que los experimentos de videomicroscopía descartaron el uso de laminina como sustrato. Para facilitar la posterior cuantificación, las células se marcaron con una sonda fluorescente vital (CFSE 1 μM) antes del ensayo. En la figura 22B se muestran imágenes de microscopía confocal, donde se puede apreciar la superficie inferior de la membrana transcurrido el tiempo del ensayo en ausencia o en presencia de CXCL12 (Fig. 22B izquierda y centro, respectivamente). Para cuantificar los experimentos, se comprobó la relación lineal entre los niveles de fluorescencia y el número de células presente en la membrana, siempre que éstas formen una monocapa (Fig. 22C).

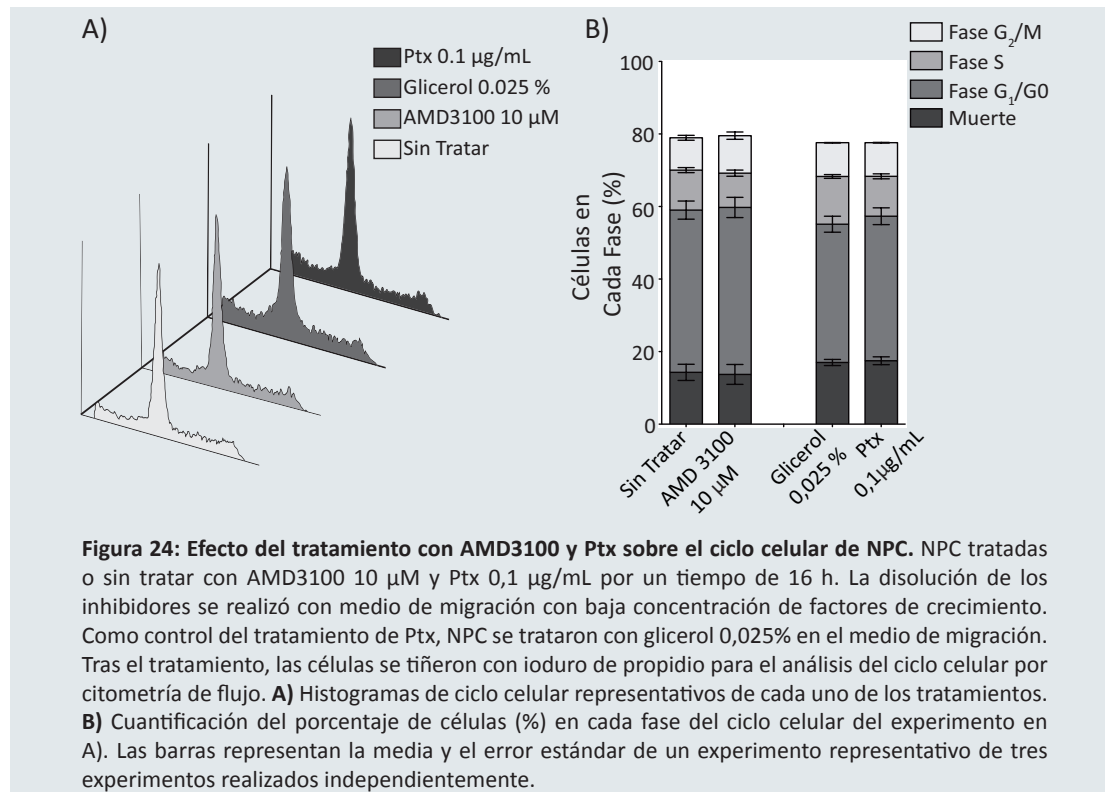


Figura 24: Efecto del tratamiento con AMD3100 y Ptx sobre el ciclo celular de NPC. NPC tratadas o sin tratar con AMD3100 10 μM y Ptx 0,1 $\mu\text{g/mL}$ por un tiempo de 16 h. La disolución de los inhibidores se realizó con medio de migración con baja concentración de factores de crecimiento. Como control del tratamiento de Ptx, NPC se trataron con glicerol 0,025% en el medio de migración. Tras el tratamiento, las células se tiñeron con yoduro de propidio para el análisis del ciclo celular por citometría de flujo. **A)** Histogramas de ciclo celular representativos de cada uno de los tratamientos. **B)** Cuantificación del porcentaje de células (%) en cada fase del ciclo celular del experimento en A). Las barras representan la media y el error estándar de un experimento representativo de tres experimentos realizados independientemente.

Primero, al igual que en los ensayos de videomicroscopía, se valoró la capacidad migratoria en los medios de migración, observando que las mejores condiciones se producían con CXCL12 50 nM en el medio de migración que contenía 1 ng/mL EGF y 1 ng/mL FGF. Sin embargo, cuando el medio de migración contenía factores de crecimiento a la concentración utilizada para el cultivo de NPC (20 ng/mL EGF y 20 ng/mL FGF), el efecto de CXCL12 se perdía (Fig. 22D), al igual que ocurrió en los ensayos de videomicroscopía (Fig. 8E y F).

La migración promovida por CXCL12 es específica, ya que la inversión del gradiente (añadiendo CXCL12 100 nM en el compartimento superior) redujo el porcentaje de células migradas significativamente (Fig. 23A). Además, el tratamiento de NPC con el inhibidor específico de CXCR4 (AMD 3100) bloqueó completamente la respuesta a CXCL12 (Fig. 23B), lo que demuestra la participación de CXCR4 en la migración de estas células. Por otro lado, el hecho de que la migración sea bloqueable por tratamiento con Ptx (0,1 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 23C), es indicativo de que G α i es importante para la migración de NPC. En paralelo, estudiamos el

efecto de estos inhibidores sobre el ciclo celular de NPC (Fig. 24) descartando alteraciones en la viabilidad celular en los diferentes tratamientos y demostrando la especificidad de los efectos observados en migración.

4.3.- Identificación de Rutas de Señalización Implicadas en la Migración de NPC

Una vez puesto a punto un sistema reproducible que nos permite evaluar la migración de NPC en respuesta a un quimioatrayente, realizamos ensayos dirigidos a estudiar los mecanismos intracelulares implicados. Para ello, empezamos realizando experimentos de quimiotaxis en presencia de inhibidores específicos de distintas rutas de señalización. Así, observamos que el uso de los inhibidores: JAK2 Inhibitor II (10 μ M, inhibidor de Jak2), LY294002 (10 μ M, inhibidor genérico de PI3K) y UO126 (10 μ M, inhibidor de Erk-1/2) bloqueó la migración de NPC en respuesta a CXCL12 (Fig 25A, B y C respectivamente).

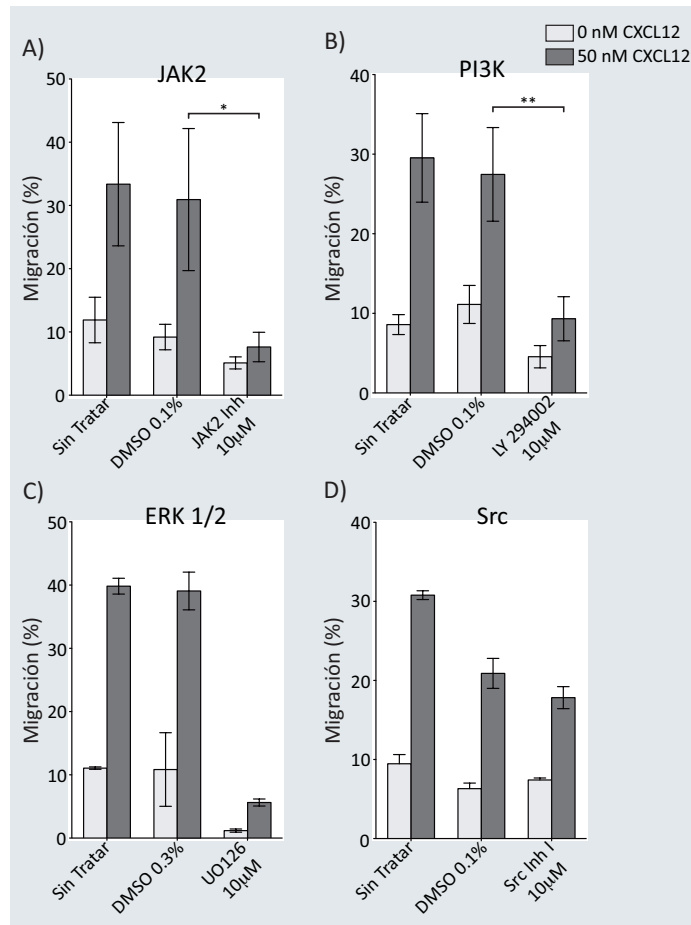
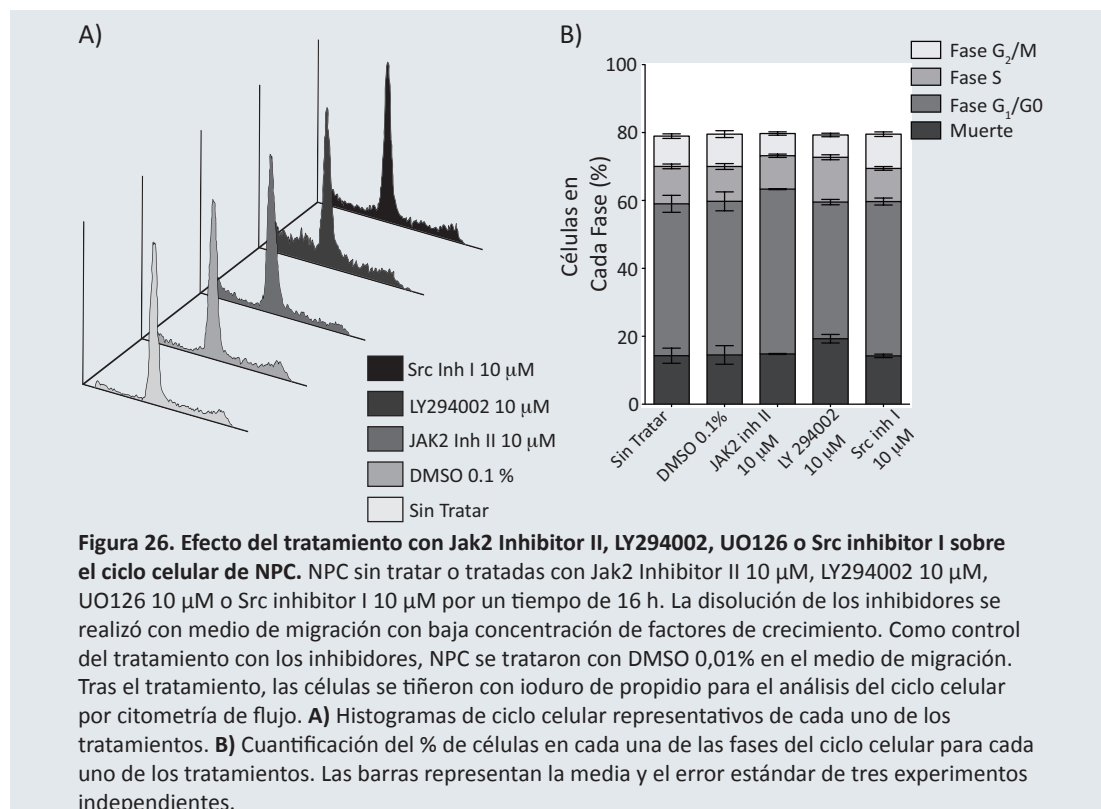


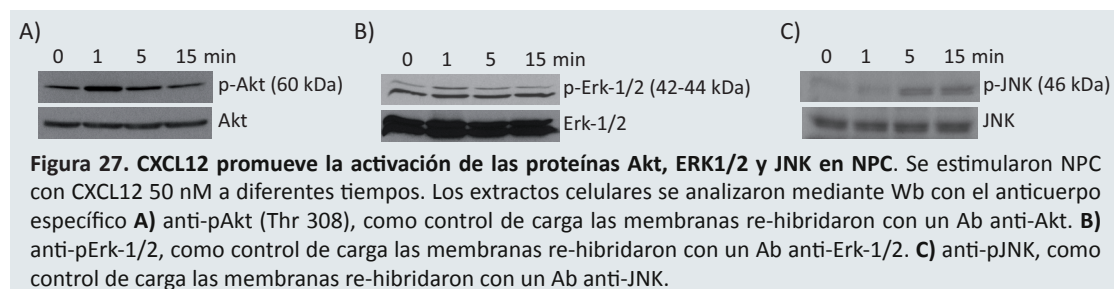
Figura 25: Rutas de señalización implicadas en migración. Se realizaron ensayos de quimiotaxis en respuesta a CXCL12 50 nM en presencia o en ausencia de inhibidores específicos de distintas proteínas implicadas en señalización por quimioquinas. **A)** migración (%) de NPC sin tratar (izquierda), control (tratadas con DMSO 0,1 %, centro) y tratadas con Jak2 Inhibitor II 10 μ M (inhibidor de Jak2, derecha). **B)** Migración (%) de NPC sin tratar (izquierda), control (tratadas con DMSO 0,1 %, centro) y tratadas con LY294002 10 μ M (Inhibidor genérico de PI3K, derecha). **C)** Migración (%) de NPC sin tratar (izquierda), control (tratadas con DMSO 0,1 %, centro) y tratadas con UO126 10 μ M (Inhibidor de Erk-1/2, derecha). **D)** Migración (%) de NPC sin tratar (izquierda), control (tratadas con DMSO 0,1 %, centro) y tratadas con Src Inhibitor I 10 μ M (Inhibidor genérico de Src, derecha). En A) y B) las barras representan la media y el error estándar de tres experimentos independientes. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de student. *P < 0,05; **P < 0,01. En C) y D) Las barras representan la media y el error estándar de un experimento representativo de tres experimentos realizados independientemente.

El efecto de los inhibidores es específico y no afectó a la viabilidad celular como demostró el análisis del ciclo celular, (Fig. 26). Por otro lado, el tratamiento de NPC con Src Inhibitor I (10 μ M, inhibidor genérico de Src) no alteró la migración de NPC a favor del gradiente de CXCL12 (Fig. 25D) ni afectó a la viabilidad celular (Fig. 26). Estos resultados sugieren que las rutas de señalización que implican a Jak, PI3K y Erk-1/2, juegan un papel importante en la migración de NPC promovida por CXCL12.

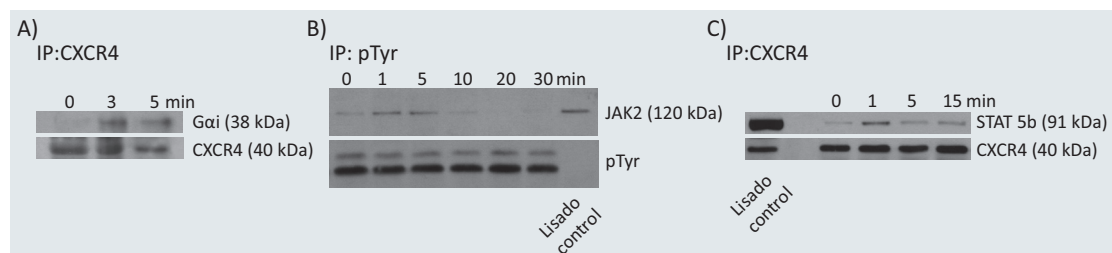


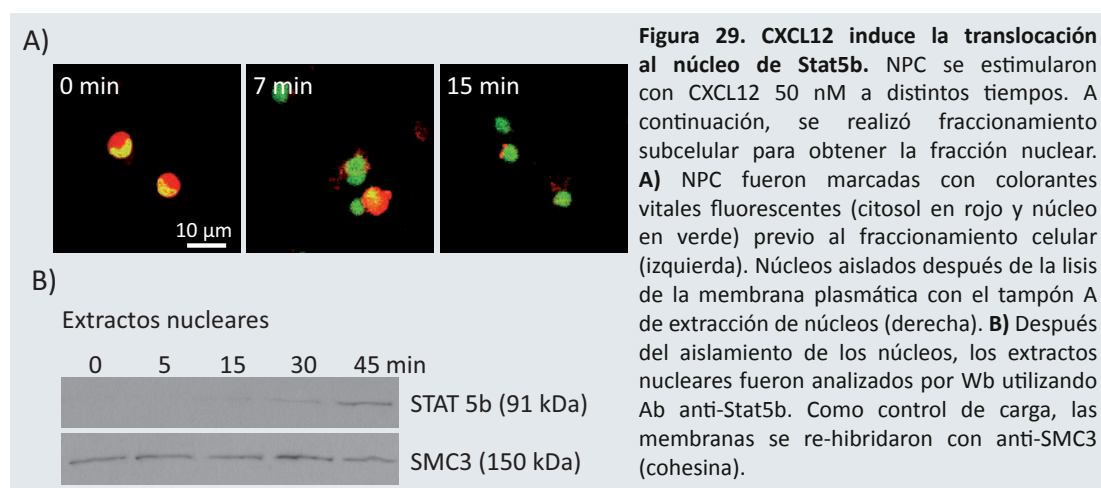
4.4.- Estudio Bioquímico de la Activación de la Ruta Jak-Stat, PI3K y MAPK en NPC Inducida por CXCL12.

Con el objetivo de confirmar los datos con inhibidores, estudiamos si estas rutas de señalización eran activadas por CXCL12 en NPC. La estimulación con CXCL12 50 nM produjo una rápida y transitoria fosforilación de Akt en la Thr 308 (Fig. 27A). La fosforilación en Akt se relaciona con un aumento de la actividad de PI3K, confirmando la implicación de esta familia de lípido quinasas en la señalización por CXCL12. En cuanto a la superfamilia de serin/treonina quinasas pertenecientes a las MAPK, encontramos que CXCL12 produjo un aumento transitorio de la fosforilación de Erk-1/2 (Fig. 27B) y de JNK (Fig. 27C).



Característico de la señalización mediada por GPCR es la activación de proteínas G heterotriméricas. En el caso de las quimioquinas, la más frecuentemente asociada es la proteína $G\alpha_i$. Como podemos observar en inmunoprecipitados de CXCR4 a partir de lisados de NPC estimulados con CXCL12 (50 nM), la proteína $G\alpha_i$ se asocia al receptor de forma transitoria (Fig. 28A).

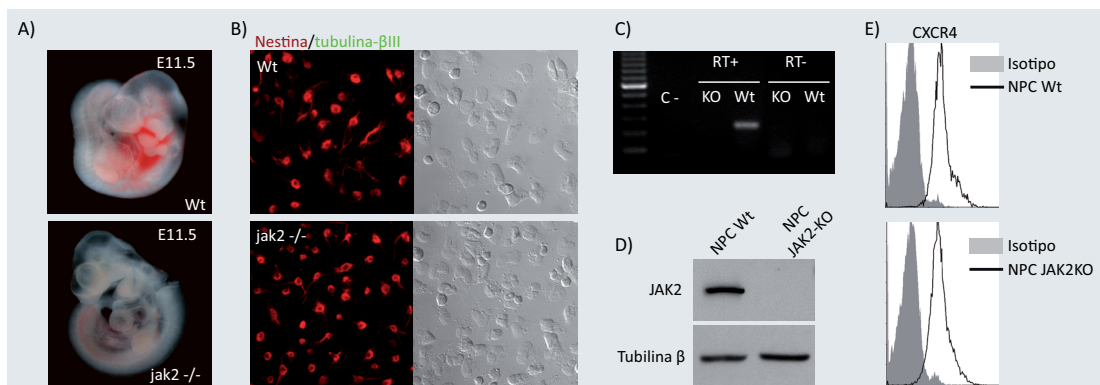




Para analizar el efecto de CXCL12 sobre las Jak, NPC estimuladas con CXCL12 fueron lisadas y los extractos celulares fueron inmunoprecipitados con Ab anti-pTyr y analizados por Western blot con Ab anti-Jak2 específico. Así, encontramos que Jak2 se activaba transitoriamente tras la estimulación con CXCL12 (Fig. 28B). También observamos en IP de CXCR4 que Stat 5b, una de las moléculas diana de Jak2, se asocia al receptor (Fig. 28C). Finalmente, el fraccionamiento subcelular (Fig. 29A) de NPC estimuladas con CXCL12 mostró un enriquecimiento de Stat5b en la fracción nuclear (Fig. 29B), demostrando la translocación de este factor de transcripción al núcleo una vez activado por Jak2.

4.5.- Estudio del Papel de Jak2 en la Migración de NPC en Respuesta a CXCL12.

Aunque los inhibidores químicos se diseñan para una molécula determinada, puede ocurrir que bloqueen la actividad de otras quinasas de forma inespecífica y que ello afecte también a la función estudiada. Para estudiar más en profundidad el papel de Jak2 en la migración promovida por CXCL12 en NPC, decidimos utilizar NPC derivadas del ratón deficiente en Jak2 (NPC Jak2-KO). Esta mutación resulta letal en ratón a E12,5-E13,5, debido a defectos graves en eritropoyesis (Parganas et al., 1998). Con el objetivo de obtener NPC de estos ratones, decidimos utilizar embriones de estadios más tempranos E10,5 y E11,5. A estos estadios, la reducción del número de embriones en proceso de reabsorción respecto a E12,5 denota una mayor viabilidad. El cultivo de NPC derivadas de embriones E10,5 tanto de ratones control como deficientes en Jak2, mostraba unas características diferentes a los cultivos de NPC derivados de embriones de E14,5, por lo que fueron descartados. En particular, las células crecían en monocapa y el número de neuroesferas formado era mucho menor (datos no mostrados). Esto, podría deberse a: un distinto comportamiento de NPC de esos estadios o, a



que, debido al pequeño tamaño de las vesículas telencefálicas a E10,5, los cultivos estuviesen contaminados con otro tipo celular diferente.

Se cultivaron neuroesferas de embriones E11,5 en las mismas condiciones que los cultivos de neuroesferas de embriones E14,5. Para se extrajeron NPC de embriones control y los Jak2-KO, que se diferencian por la ausencia de sangre en el hígado y corazón (Fig. 30A) que determina la muerte de los embriones Jak2-KO. Para confirmar, los cultivos de neuroesferas se genotiparon por PCR convencional (Fig. 30C) y la ausencia de expresión de Jak2 en las células procedentes de embriones deficientes fue comprobada por WB a partir de lisados de neuroesferas (Fig. 30D). Los cultivos de neuroesferas formados a partir de NPC Jak2-KO no presentaban diferencias apreciables en cuanto al número de neuroesferas, al tamaño de éstas y a la velocidad de crecimiento (datos no mostrados) comparando con los controles. Se caracterizaron los cultivos de neuroesferas por inmunofluorescencia con nestina/tubulina β III y

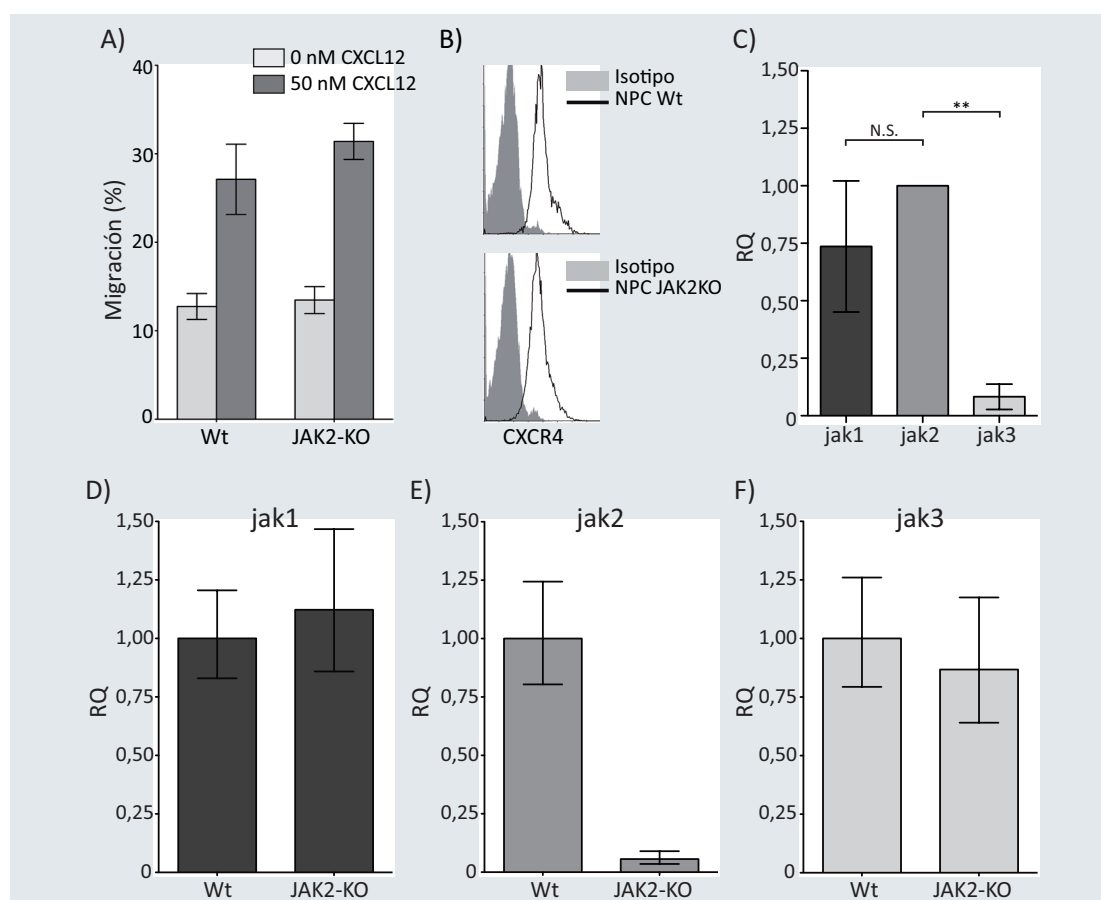
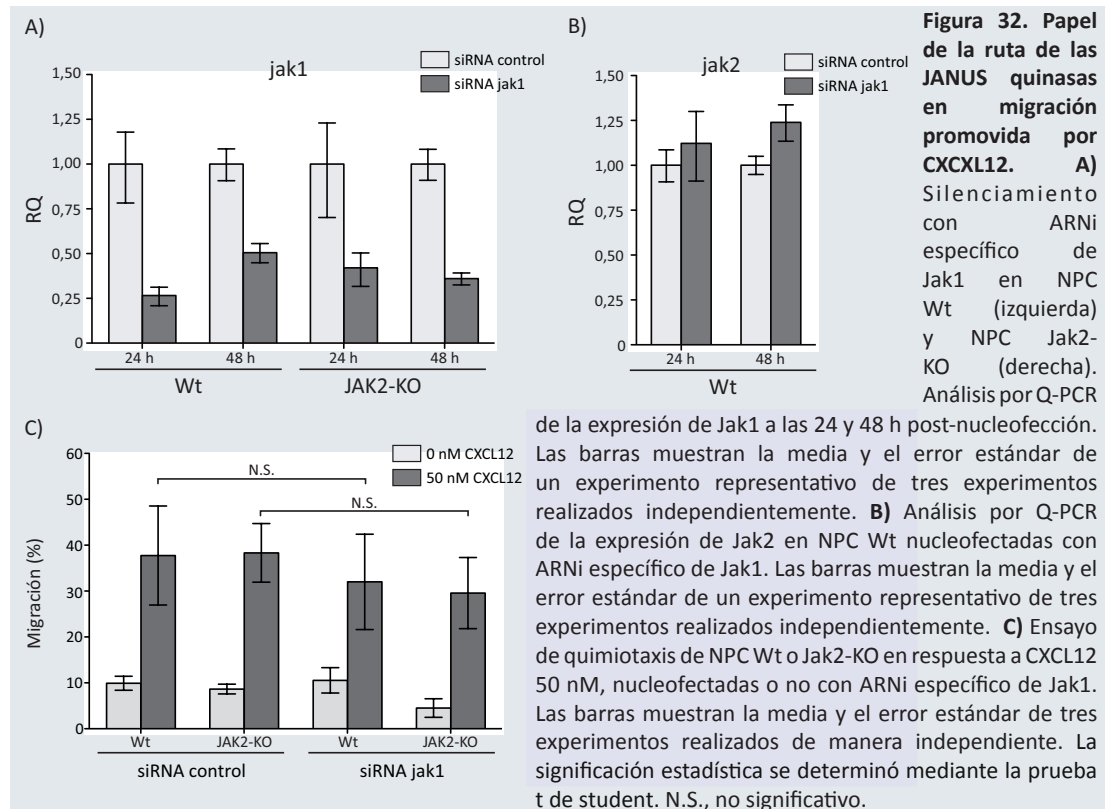


Figura 31. Papel de Jak2 en la quimiotaxis inducida por CXCL12. **A)** Ensayo de quimiotaxis de NPC Wt (izquierda) y NPC Jak2-KO (derecha) en respuesta a CXCL12 50 nM. **B)** Se determinó la expresión de CXCR4 en la superficie celular de NPC Wt (arriba) y NPC Jak2-KO (abajo) por citometría de flujo con Ab anti-CXCR4. Como control negativo se utilizó un anticuerpo inespecífico del mismo isotipo que el anti-CXCR4. **C)** Análisis por Q-PCR de la expresión de otros miembros de la familia Jak en relación con la expresión de Jak2 en NPC Wt. Las barras representan la media y el error estándar de tres experimentos realizados independientemente. La significación estadística (*) se determinó mediante una prueba t de student. N.S., no significativo; **P < 0,01. En **D)**, **E)** y **F)** se muestra la comparación entre los niveles de expresión de otros miembros de la familia Jak en NPC Wt (izquierda) y NPC Jak2-KO (derecha) por Q-PCR. **D)** niveles de Jak1, **E)** niveles de Jak2 y **F)** niveles de Jak3. **D)**, **E)** y **F)** muestran la media y el error estándar de un experimento representativo de tres experimentos realizados de manera independiente.

nestina/GFAP de células derivadas de NPC control y NPC Jak2-KO. La mayoría de las células que constituyen las neuroesferas son NPC, como se denota por el marcaje de nestina (Fig. 30B). Sin embargo, a E11,5 el número de neuronas maduras encontradas (tanto en los cultivos

control como Jak2-KO) es mucho más bajo (Fig. 30B) que el encontrado en neuroesferas control derivadas de embriones de E14,5 (Fig. 13). Una posible explicación sería que al derivar los cultivos de embriones de estadios muy tempranos, estas células tengan más tendencia a permanecer como células indiferenciadas y proliferar en lugar de diferenciarse a células maduras. Al igual que en neuroesferas de E14,5, en los cultivos de neuroesferas de E11,5 no se encontraron astrocitos maduros (resultados no mostrados).



El siguiente paso fue evaluar la respuesta migratoria de NPC Jak2-KO en experimentos de quimiotaxis *in vitro* usando CXCL12 como estímulo. Como control, se utilizaron NPC derivadas de embriones Wt de la misma camada que las NPC Jak2-KO. Las NPC Jak2-KO migraban exactamente igual que los controles (Fig. 31A). Los niveles de CXCR4 eran los mismos en ambos genotipos (Fig. 31B). La discrepancia con los resultados obtenidos con el inhibidor Jak2 Inhibitor II (Fig. 25A) podría explicarse por un efecto inespecífico del inhibidor o a que otros miembros de la familia de las JANUS quinasas sustituyeran a Jak2 en su ausencia, teniendo, por tanto, funciones redundantes en el proceso analizado.

Para discernir entre estas dos posibilidades, estudiamos por PCR semicuantitativa la expresión de otros miembros de la familia JANUS quinasas en NPC Wt y Jak2-KO. Comparando los niveles de expresión de otros miembros de la familia JANUS respecto los niveles de Jak2 en la células Wt, observamos que las NPC Wt expresan Jak1 en niveles comparables a Jak2 y niveles mucho más reducidos de Jak3 (Fig. 31C). En este punto, pensamos que quizás los niveles de Jak1 y Jak3 estuviesen alterados en NPC Jak2-KO respecto a NPC Wt. Por ello, se compararon por PCR semicuantitativa los niveles de Jak1 y Jak3 en ambas líneas de NPC, observando que la expresión de Jak1 y Jak3 no se encuentra alterada en NPC Jak2-KO (Fig. 31D y F, respectivamente).

La alta expresión de Jak1 en NPC Jak2-KO podría apoyar la posibilidad de redundancia entre Jak2 y Jak1. Para evaluar esta hipótesis, realizamos experimentos de silenciamiento génico con una mezcla de ARNi específicos para Jak1. El ARNi fue introducido en las células NPC Wt y Jak2-KO por nucleofección. Los resultados fueron analizados a las 24 y 48 h tras nucleofección por PCR semicuantitativa, observando un eficiente silenciamiento de Jak1 en NPC Wt y Jak2-KO (Fig. 32A). El silenciamiento es específico ya que los niveles de Jak2 en NPC Wt no están afectados tras el silenciamiento de Jak1 (Fig. 32B). A continuación, se realizaron experimentos de trans migración para evaluar la respuesta de las NPC Jak2-KO/Jak1-KD (Knock down) a CXCL12. No observamos ningún defecto en la migración de ninguna de las líneas ensayadas al compararlas con las células control (electroporadas con ARNi control) (Fig. 32C). Esta nueva discrepancia con los experimentos de trans migración utilizando el inhibidor de Jak2 pone de manifiesto que, probablemente, el inhibidor esté bloqueando, inespecíficamente, otras quinasas que participan en migración celular. Además, estos datos descartan que, aunque Jak2 se activa como consecuencia de la estimulación con CXCL12 en NPC, las JANUS quinasas intervengan en su movimiento mediado por CXCL12.

4.6.- Estudio del Papel de PI3K en la Migración de NPC en Respuesta a CXCL12.

Los análisis usando inhibidores químicos señalan a PI3K como enzima implicada en la migración de NPC (Fig. 25B). Es de sobra conocido el papel que desempeña PI3K en migración en otros tipos celulares y, sobre todo, en células del sistema inmunológico. Existen estudios que describen la participación en migración de las cuatro subunidades catalíticas de PI3K de clase I, aunque la implicación de uno u otro tipo de subunidad catalítica, parece depender tanto del tipo celular como de la naturaleza del quimioatrayente (Cain and Ridley, 2009). Por eso, y debido a la ausencia de datos en NPC, decidimos estudiar si la migración de NPC en respuesta a CXCL12 usaba, preferentemente, alguna isoforma de p110.

4.6.1.- Estudio de las distintas isoformas de p110 en NPC.

De las cuatro subunidades catalíticas de PI3K de clase I, p110 α y β tienen una expresión ubicua, mientras que p110 δ y γ parecen más específicas de células del sistema inmunológico. Sin embargo, p110 δ también se expresa en neuronas sensoriales durante el desarrollo embrionario jugando un papel importante en el crecimiento axonal (Eickholt et al., 2007), proceso que, por otro lado, presenta gran homología con la migración celular. Primero, determinamos los miembros de PI3K de clase I expresados en nuestras NPC, tanto a nivel de ARNm como de proteína. Por PCR cuantitativa (Q-PCR) absoluta, observamos que las isoformas mayoritarias en NPC son p110 α y β (Fig. 33A). Por el contrario, los niveles de expresión de p110 δ y γ están muy disminuidos, 4 veces menos p110 δ y 10 veces menos p110 γ respecto de los niveles de las

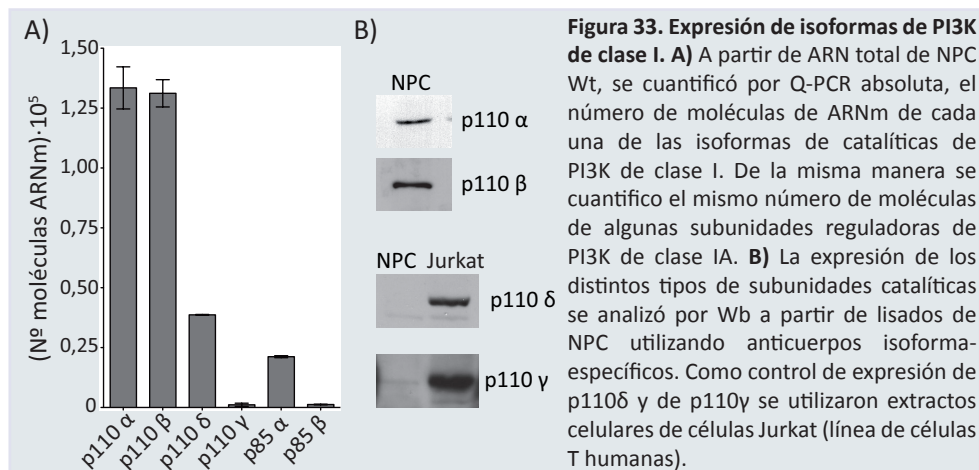
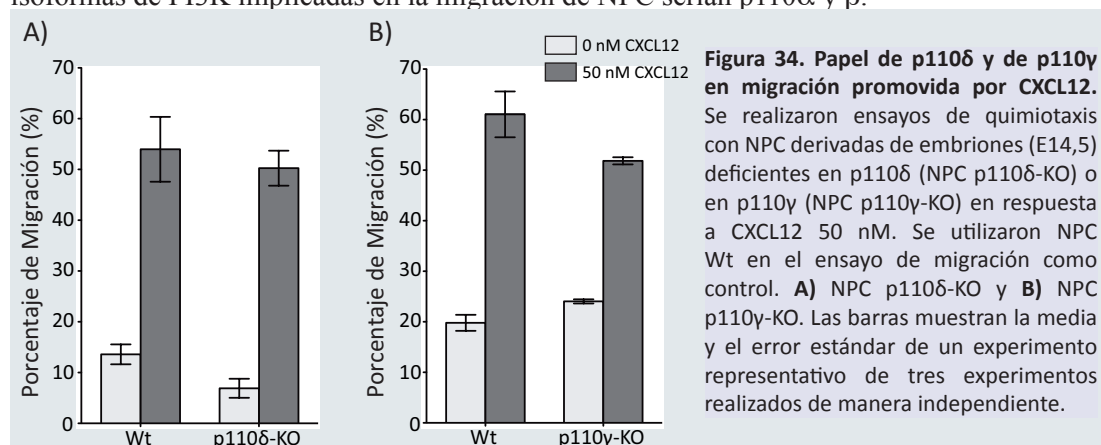


Figura 33. Expresión de isoformas de PI3K de clase I. A) A partir de ARN total de NPC Wt, se cuantificó por Q-PCR absoluta, el número de moléculas de ARNm de cada una de las isoformas de catalíticas de PI3K de clase I. De la misma manera se cuantifico el mismo número de moléculas de algunas subunidades reguladoras de PI3K de clase IA. **B)** La expresión de los distintos tipos de subunidades catalíticas se analizó por Wb a partir de lisados de NPC utilizando anticuerpos isoforma-específicos. Como control de expresión de p110 δ y de p110 γ se utilizaron extractos celulares de células Jurkat (línea de células T humanas).

isoformas mayoritarias (Fig. 33A). De manera semejante a lo observado por QPCR, en lisados de NPC se detectó por Wb, utilizando Ab específicos, la expresión de p110 α y β (Fig. 33B) y no se detectaron ni p110 δ ni γ (Fig. 33B). Como control, se detectó la expresión de p110 δ y γ en lisados de células Jurkat (línea de linfocitos T humanos) (Fig. 33B).

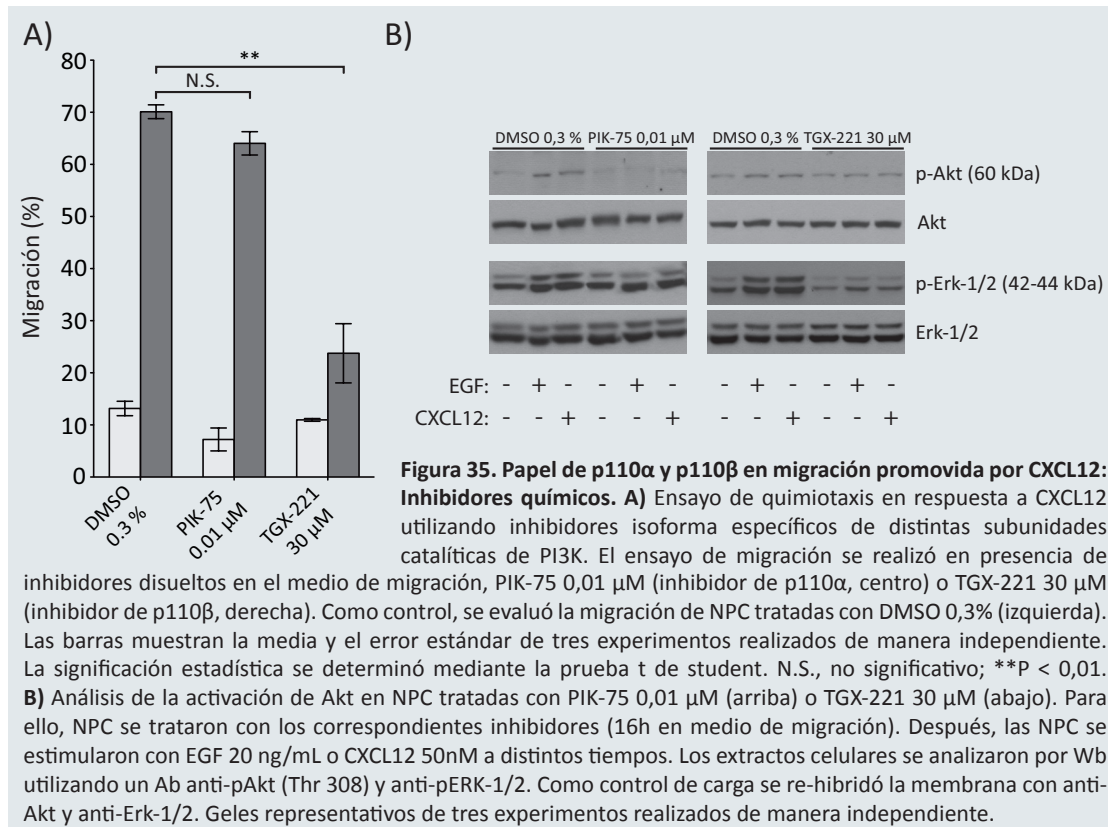
4.6.2.- Estudio de la migración en respuesta a CXCL12 de NPC derivadas de ratones deficientes en p110 δ y en p110 γ .

Debido a la baja expresión de p110 δ y γ en NPC, hipotetizamos que la participación de estas isoformas en la migración mediada por CXCL12 sería baja o nula. Sin embargo, para descartar su participación, realizamos ensayos de migración con NPC aisladas de los correspondientes ratones deficientes en p110 δ (Okkenhaug et al., 2002) y en p110 γ (Sasaki et al., 2000). Dado que estos ratones mutantes son viables en homocigosis, se aislaron NPC a E14,5 de ambos genotipos y se crecieron como neuroesferas. En paralelo, y como control, se aislaron NPC Wt en el mismo estadio. La ausencia de p110 δ o p110 γ no afectó ni a la formación de las neuroesferas ni a su crecimiento (datos no mostrados). Por otro lado, tanto las NPC p110 δ -KO (Fig. 34A) como las NPC p110 γ -KO (Fig. 34B) respondieron a CXCL12 de igual modo que las células Wt en ensayos de quimiotaxis. Estos resultados sugieren que las isoformas de PI3K implicadas en la migración de NPC serían p110 α y β .



4.6.3.- Estudio del papel de p110 α y β en la migración de NPC en respuesta a CXCL12.

Estudios de migración en otros tipos celulares demuestran que tanto p110 α como β son importantes para la migración. Además, en células endoteliales, la implicación de una u otra isoforma depende del ligando utilizado como quimioatrayente. Mientras p110 α media la migración inducida por VEGF, CXCL12 requiere p110 β (Graupera et al., 2008). En nuestro estudio, no se pudieron emplear NPC derivadas de ratones deficientes de estas isoformas, ya que ambos ratones muestran una letalidad embrionaria temprana (E9,5 para p110 α y en estadio de blástula para p110 β) (Bi et al., 2002; Bi et al., 1999) lo que imposibilita el aislamiento de NPC. Realizamos entonces ensayos de quimiotaxis con NPC tratadas con inhibidores químicos “isoforma-específicos” (PIK-75 de p110 α y TGX-221 de p110 β) (Jackson et al., 2005; Knight et al., 2006). Ensayos de migración utilizando PIK-75 a 0,08 μ M (Marques et al., 2009) durante



el ensayo, mostraron un fuerte bloqueo en la migración en respuesta a CXCL12 (datos no mostrados). Sin embargo, el examen exhaustivo de las imágenes de la membrana mostró que la viabilidad de las NPC estaba seriamente comprometida en presencia de este inhibidor, por lo que el defecto en migración debe ser atribuido a un efecto tóxico del inhibidor sobre la viabilidad celular. Por ello, utilizamos concentraciones inferiores de PIK-75 (0,01 μM) donde la viabilidad no estuviese afectada (datos no mostrados). El tratamiento con PIK-75 0,01 μM de NPC durante el ensayo de migración, no mostraba defectos en la migración en comparación con las células control (Fig. 35A). Estos resultados indican que la actividad de p110α no está involucrada en la migración de NPC en respuesta a CXCL12, o que la concentración de PIK-75 (0,01 μM) usada no es suficiente para bloquear la actividad p110α completamente. Para descartar esta última posibilidad, NPC tratadas con PIK-75 0,01 μM y células control (en iguales condiciones que en los ensayos de migración) se estimularon con CXCL12 (50 nM) o EGF (20 ng/mL) a distintos tiempos y la fosforilación de Akt fue determinada por Wb de los extractos celulares. El tratamiento con PIK-75 0,01 μM produjo una disminución en los niveles de fosfo-Akt (Thr 308) (Fig. 35B). Estos datos, en conjunto, indican que el tratamiento con PIK-75 0,01 μM es suficiente para el bloqueo de la actividad de p110α y que su inhibición no afecta a la respuesta de NPC a CXCL12 en ensayos de migración.

A diferencia de PIK-75, el tratamiento con el inhibidor específico de p110β, TGX-221 (30 μM) (Marques et al., 2009) bloqueó casi completamente la migración de NPC inducida por CXCL12 (Fig. 35A) sin afectar a su viabilidad (datos no mostrados). El análisis por Wb de NPC, pretratadas o no con TGX-221 30 μM y estimuladas con CXCL12 o EGF, mostró una disminución en los niveles de fosfo-Akt, demostrando su acción bloqueante sobre p110β en las condiciones utilizadas en estos ensayos. Por tanto, los datos utilizando inhibidores específicos

de isoforma, indican que sería la subunidad catalítica p110 β , y no la p110 α , la implicada en regular las rutas de señalización necesarias en la migración de NPC.

4.6.4.- Silenciamiento de p110 β con shRNA específico de p110 β .

Para descartar posibles efectos inespecíficos del inhibidor TGX-221 y confirmar el efecto observado, silenciamos la expresión de p110 β en NPC. Para ello, se nucleofectaron NPC Wt con un plásmido (pRS) que codifica para un ARN pequeño horquillado (shRNA, de inglés “short hairpin RNA”) específico de p110 β (shRNA-p110 β), que había probado un silenciamiento efectivo en otros sistemas celulares (Marques et al., 2008; Marques et al., 2009). Como control, se utilizaron NPC Wt nucleofectadas con el mismo plásmido, pero que contenía un shRNA inespecífico (shRNA-control). El análisis de las células nucleofectadas por PCR semicuantitativa mostró una reducción eficiente de la expresión de p110 β a nivel de ARNm a las 48 h post-nucleofección (Fig. 36A) sin afectar la expresión de p110 α (Fig. 36A).

Ensayos preliminares de quimiotaxis mostraron que las células nucleofectadas con

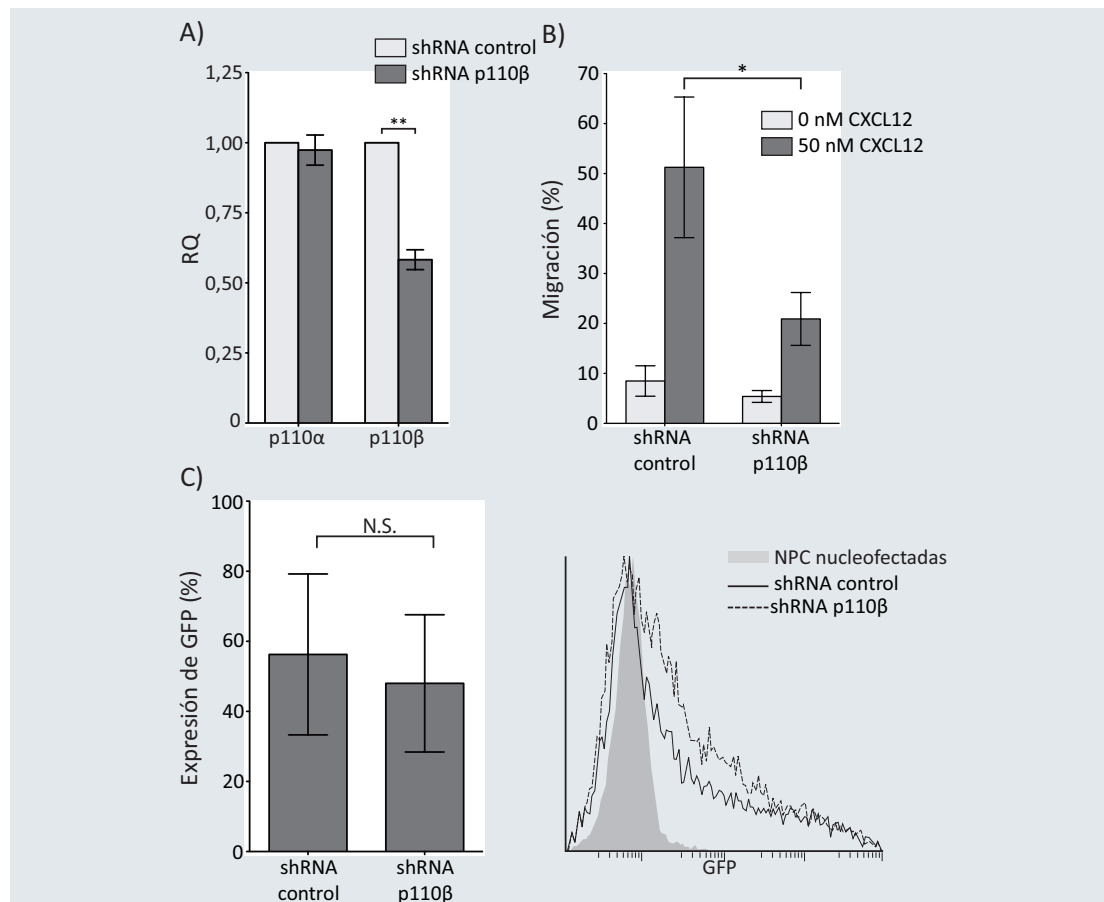
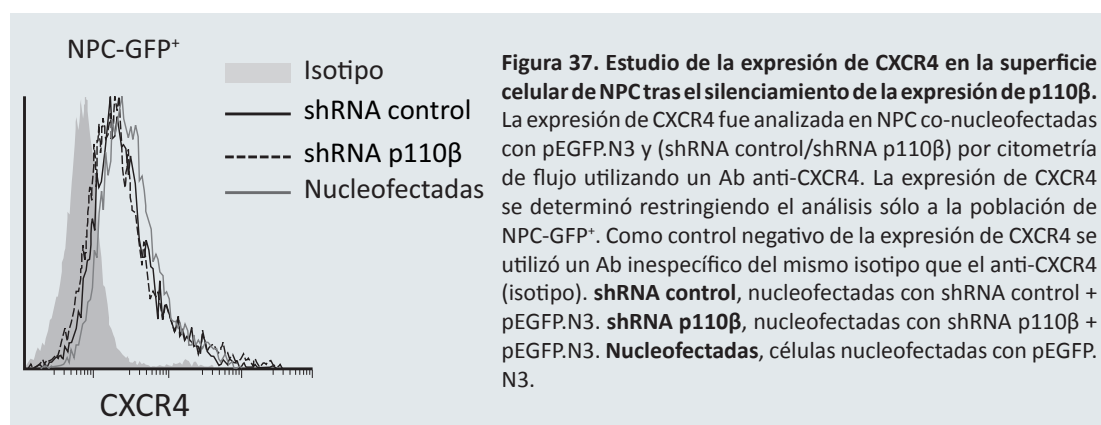


Figura 36. La actividad de p110 β es imprescindible para la migración de NPC en respuesta a CXCL12: Experimentos de silenciamiento génico. A) Análisis por Q-PCR de la expresión de p110 α (izquierda) y p110 β (derecha) en NPC 48 h tras nucleofección con shRNA específico para p110 β (shRNA p110 β). Como control, NPC nucleofectadas con un plásmido que codifica para un shRNA inespecífico (shRNA control). Las barras representan la media y el error estándar de tres experimentos realizados de manera independiente. **B)** Ensayo de quimiotaxis en respuesta a CXCL12 50 nM de NPC nucleofectadas con shRNA p110 β o shRNA control. Para facilitar la cuantificación, NPC shRNA p110 β y shRNA control fueron co-nucleofectadas con pEGFP.N3. El ensayo de quimiotaxis se realizó 48 h post-nucleofección. Las barras representan la media y error estándar de 6 experimentos realizados de manera independiente. **C)** La eficiencia de la nucleofección se determinó en función de la expresión de GFP por citometría de flujo (histogramas representativos, derecha). Las barras representan la media y error estándar de tres experimentos realizados de manera independiente (izquierda). La significación estadística se determinó mediante una prueba t de student. N.S., no significativo; *P < 0,05; **P < 0,01.

shRNA-p110 β migraban igual que las células control (datos no mostrados). Dado que la eficiencia del silenciamiento no fue superior nunca al 50%, como determinaron los análisis por QPCR, podría ocurrir que el efecto de la deficiencia de p110 β quedara enmascarado por la presencia de las células con niveles normales de p110 β . Por ello, co-nucleofectamos las células con dos plásmidos: el plásmido que codifica para shRNA (p110 β o control) y el plásmido pEGFP.N3 en una relación (5:1) respectivamente. La expresión de GFP nos servirá de marcador para restringir el análisis de la migración a las células afectadas por el shRNA. En estas condiciones, observamos que las NPC shRNA-p110 β mostraron una reducción muy significativa en la respuesta a CXCL12 en comparación con las células nucleofectadas con shRNA-control (Fig 36B). Como control, analizamos que las células electroporadas con shRNA-control y las células shRNA-p110 β mostraban niveles similares de expresión de GFP (Fig. 36C). Además, tampoco se encontraron diferencias de expresión en la superficie de CXCR4 en la población GFP⁺ de ambos tipo celulares (Fig. 37). Por lo que, concluimos que el bloqueo que muestran las NPC nucleofectadas con shRNA-p110 β con respecto a las células control en la migración, se debe exclusivamente a la ausencia de expresión de p110 β . Estos resultados y los obtenidos con el inhibidor químico, sugieren que la actividad de p110 β es esencial para la migración de NPC.



4.7.- Estudio del Papel de p110 β en Migración de NPC en Modelos de Migración *in vivo*

Con el objetivo de estudiar la relevancia de PI3K en la migración de NPC en un contexto fisiológico, se utilizaron dos modelos *in vivo* en los que la migración de NPC está regulada por CXCL12. El primer modelo, se corresponde con un modelo de migración en el ratón adulto, en el que, tras una situación inflamatoria aguda (como la que se produce después de un proceso de hipoxia), tanto NPC endógenas como transplantadas migran en respuesta a factores quimioatrayentes secretados en la región inflamada. El segundo modelo, es un modelo de migración de NPC durante el desarrollo, que se produce durante la corticogénesis en el embrión, en el que estudiamos la llegada de las **interneuronas** originadas en la EGM a la corteza, así como su distribución en las capas de ésta.

4.7.1.- Modelo de infarto cerebral focal, por fototrombosis. Estudio de la migración de NPC exógenas al área de la lesión.

El infarto cerebral es una lesión producida por la falta de riego sanguíneo en una zona del cerebro como consecuencia de la formación de un trombo. La hipoxia producida y la falta de nutrientes, sobre todo glucosa, comprometen la viabilidad celular produciéndose muerte por necrosis: primero de neuronas (más sensibles) y luego de células de glía. Como consecuencia de la muerte celular, se produce la activación de astrocitos y células de la microglia, iniciándose una respuesta inflamatoria en el área dañada que puede comprometer más aún la viabilidad de las células en los alrededores de la lesión (zona de penumbra). Como consecuencia de la respuesta inflamatoria desencadenada en la lesión, se liberan al medio varias citoquinas y quimioquinas entre las que se encuentra CXCL12 (Bacigaluppi et al., 2009; Imitola et al., 2004; Thored et al., 2006), promoviendo la llegada de NPC hacia el área dañada (Imitola et al., 2004; Robin et al., 2006; Thored et al., 2006). Existen varios modelos animales de infarto cerebral, el más utilizado es el de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO, middle cerebral artery occlusion) (Carmichael, 2005), que suele generar lesiones en el **estriado** de tamaño más o menos variable en función de que la oclusión sea permanente o temporal (con **reperfusión**). En general, la cirugía, en este modelo, es complicada y la mortalidad de los ratones operados alta.

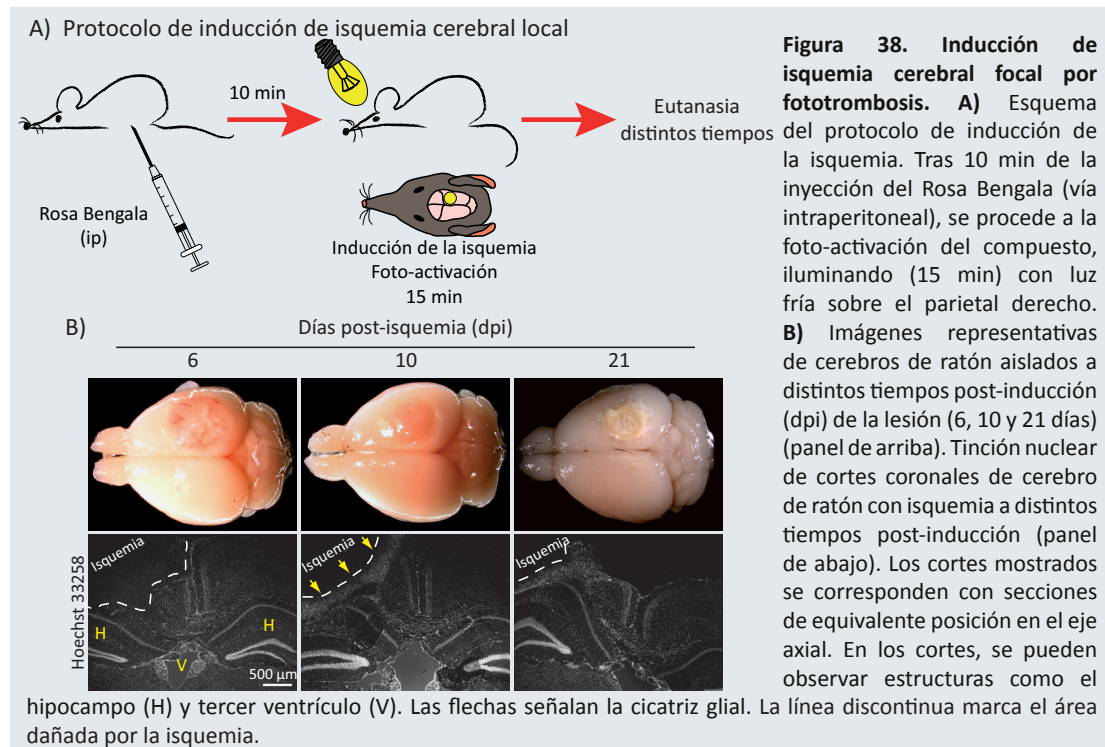
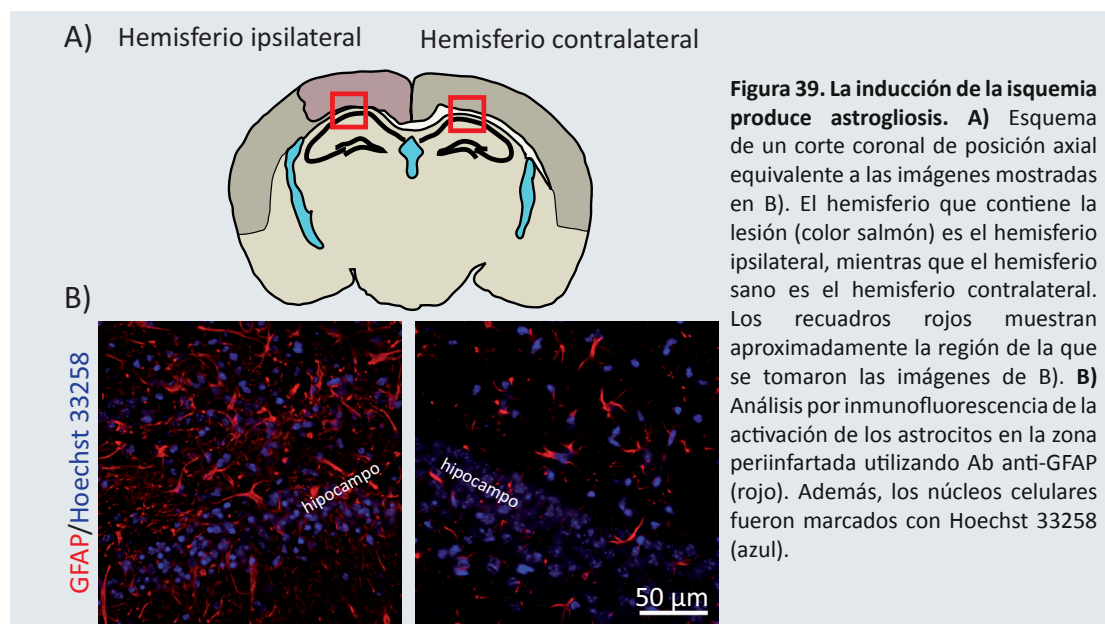
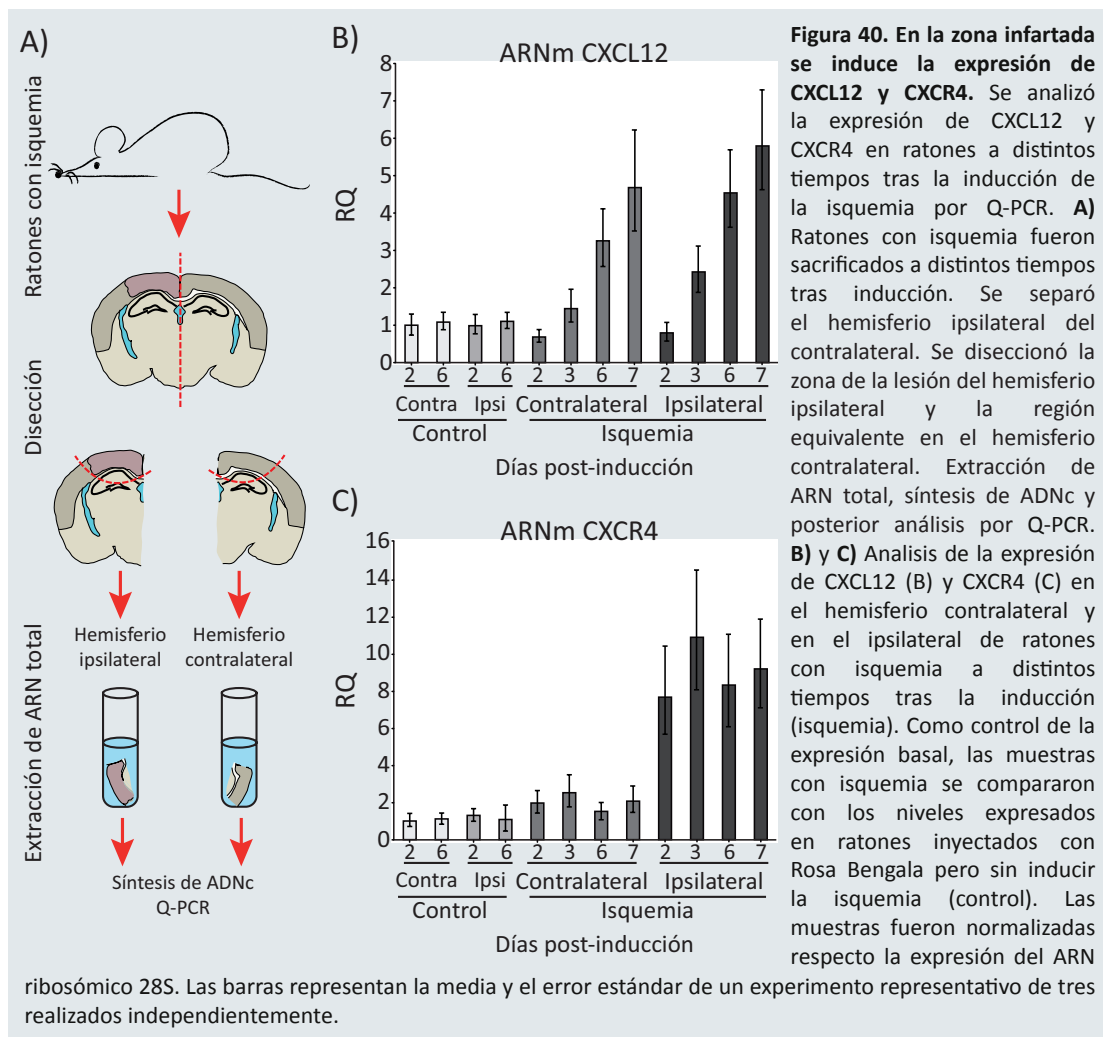


Figura 38. Inducción de isquemia cerebral focal por fototrombosis. A) Esquema del protocolo de inducción de la isquemia. Tras 10 min de la inyección del Rosa Bengala (vía intraperitoneal), se procede a la foto-activación del compuesto, iluminando (15 min) con luz fría sobre el parietal derecho.

B) Imágenes representativas de cerebros de ratón aislados a distintos tiempos post-inducción (dpi) de la lesión (6, 10 y 21 días) (panel de arriba). Tinción nuclear de cortes coronales de cerebro de ratón con isquemia a distintos tiempos post-inducción (panel de abajo). Los cortes mostrados se corresponden con secciones de equivalente posición en el eje axial. En los cortes, se pueden observar estructuras como el

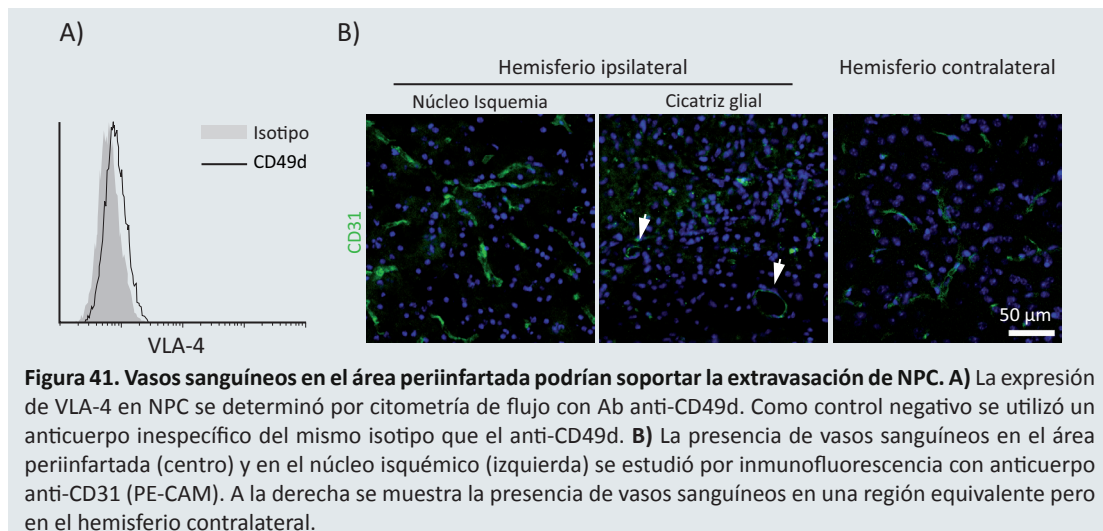
Decidimos entonces utilizar el modelo de infarto cerebral por fototrombosis (Fig. 38A) (Carmichael, 2005; Lee et al., 2007; Schroeter et al., 2002) ya que presenta una serie de ventajas técnicas sobre el modelo de oclusión de la arteria cerebral media: cirugía menos invasiva, mayor viabilidad de los ratones tras la inducción de la isquemia y mayor reproducibilidad tanto en el tamaño como en la localización de la lesión. A un grupo de ratones se les indujo infarto cerebral y se analizó la evolución de la lesión a lo largo del tiempo (Fig. 38A). A tiempos cortos, la lesión muestra mayor tamaño y, además, está constituida por tejido blando como consecuencia del edema formado tras la isquemia (Fig. 38B). Con el tiempo, la lesión disminuye en tamaño así como el edema, debido al proceso de cicatrización (Fig. 38B). En secciones coronales, la lesión es fácilmente reconocible por el escaso marcaje de ADN nuclear en la zona necrosada (Fig. 38B).





Aproximadamente a 10 días post-inducción, se observa la aparición de la cicatriz glial que separa la región necrosada de la sana y que se reconoce por el intenso marcaje de ADN nuclear rodeando a la lesión (Fig. 38B). Por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para GFAP, observamos que en la cicatriz glial se localizaba un alto número de astrocitos en comparación con la región equivalente en el **hemisferio contralateral**. Además, la intensidad de fluorescencia es mayor en los astrocitos del **hemisferio ipsilateral** en comparación con el contralateral, lo que equivale a una mayor expresión de GFAP característica de **astrocitos reactivos** (Fig. 39B).

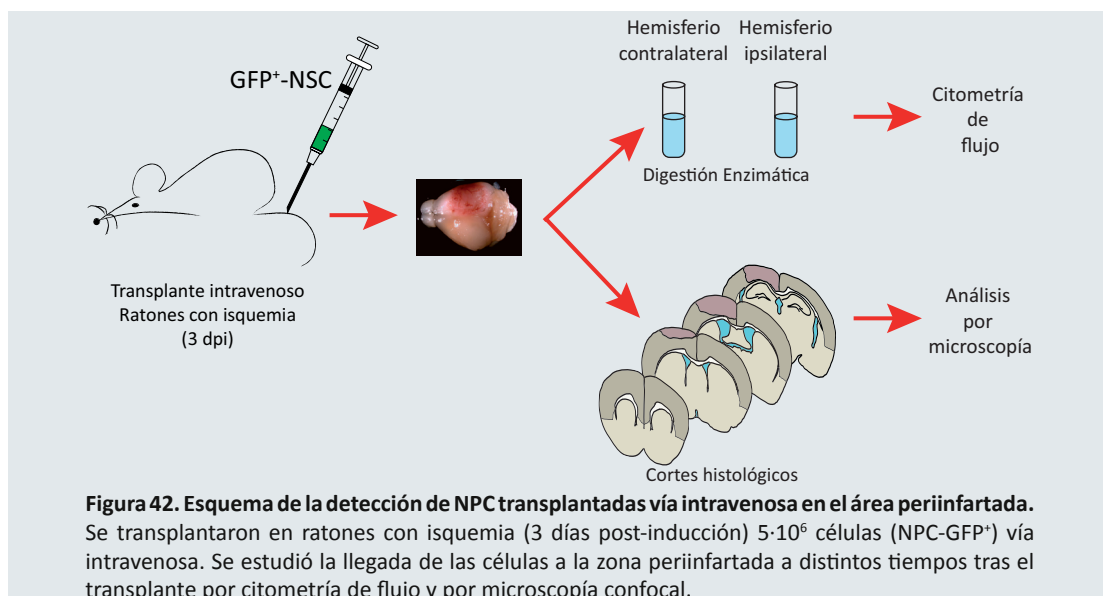
Como hemos dicho anteriormente, tras la isquemia cerebral se produce una inflamación, liberándose al medio muchas citoquinas y quimioquinas, entre ellas CXCL12. Para comprobar que en este modelo se estaba expresando también CXCL12, se extrajo ARN total del hemisferio ipsilateral y contralateral y se analizó la expresión de la quimioquina en comparación con el ARN de ratones sin isquemia (Fig. 40A). Como se puede observar, la expresión de CXCL12 aumentó con el tiempo (Fig. 40B), incluso en el hemisferio contralateral, aunque la inducción fue mayor en el hemisferio dañado. En paralelo a la expresión de CXCL12 también se observó un destacado aumento de la expresión de CXCR4 (Fig 40C), que podría explicarse por la infiltración y reclutamiento de células CXCR4⁺ en los alrededores de la lesión, como consecuencia de la inflamación.



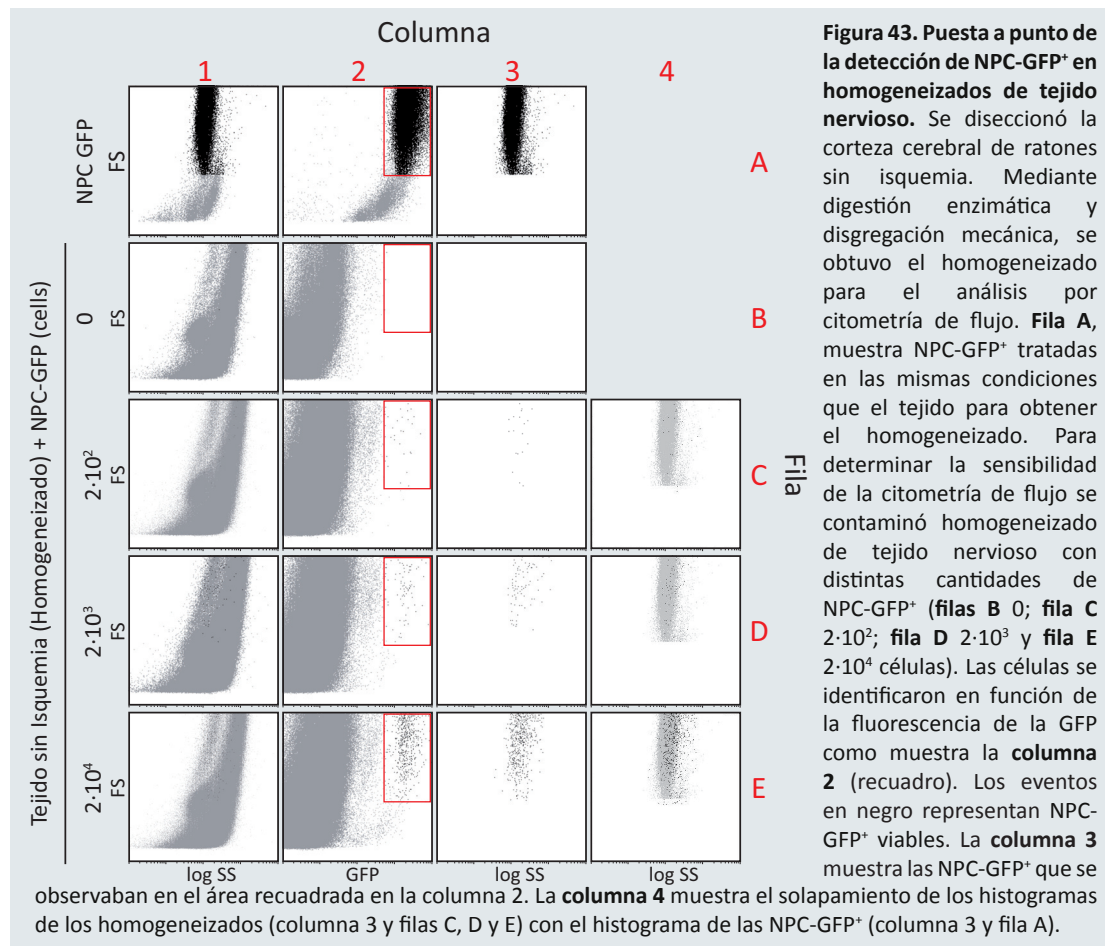
Estos resultados indican que en la evolución de la lesión causada en el modelo de infarto cerebral por fototrombosis se reproducen algunas de las características del modelo de infarto por oclusión de la arteria cerebral media: necrosis, edema y astrogliosis. Además, el aumento de la expresión de CXCL12 en el **hemisferio ipsilateral**, como consecuencia de la inflamación, parece indicar que el modelo de fototrombosis podría ser un modelo apto para estudiar la migración de NPC *in vivo*. Una vez puesto a punto y caracterizado el modelo, decidimos valorar las distintas vías de administración de NPC. Para ello, utilizamos dos vías de administración: vía intravenosa y vía intraparenquimal.

4.7.1.1.- Vía intravenosa.

La vía intravenosa es una vía de administración menos invasiva que la vía intraparenquimal, no requiere de cirugía y se pueden inyectar volúmenes grandes y mayor número de células.



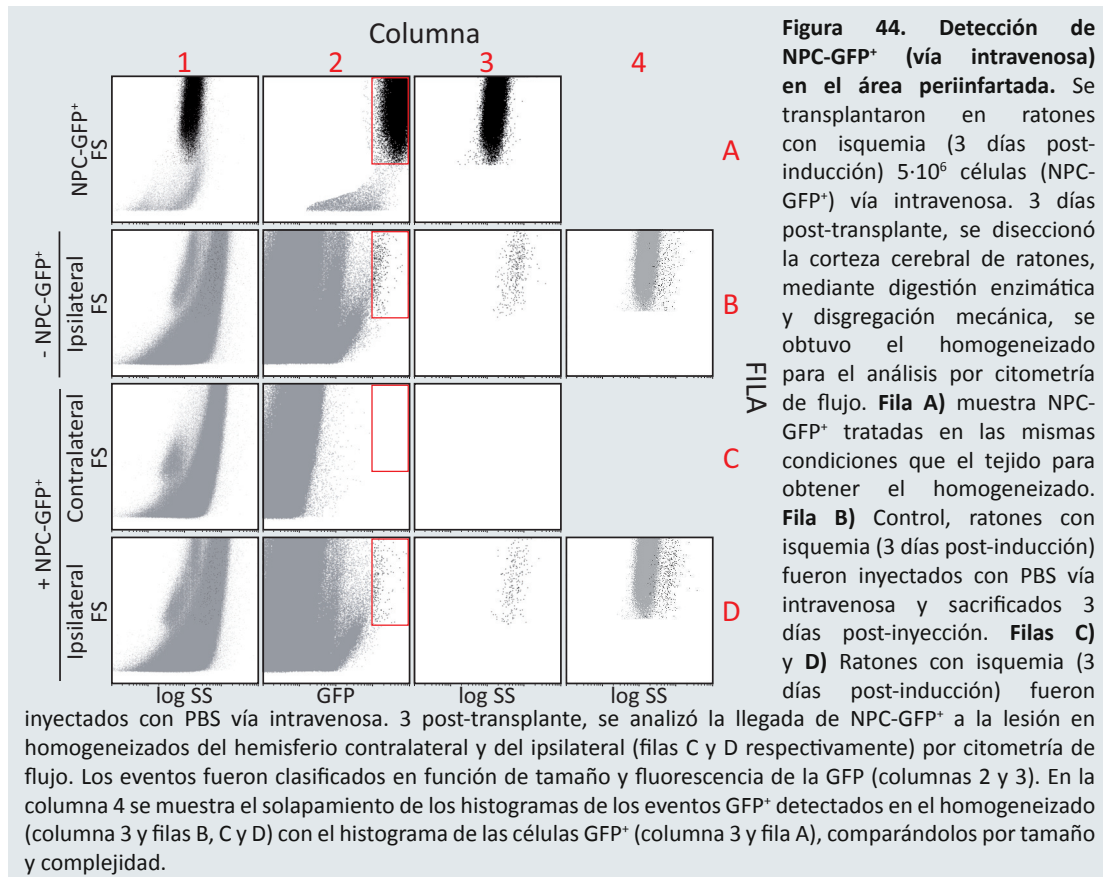
La llegada de NPC a la zona de la lesión requiere de la extravasación de las células en el torrente sanguíneo como respuesta a los gradientes quimiotácticos generados como



consecuencia de la inflamación, con lo que pensamos que podía ser un método sencillo y rápido para evaluar la migración de NPC a la lesión. Este método de transplante requiere de la adhesión de NPC en el lumen de los vasos sanguíneos como paso previo a la extravasación y entrada en el parénquima cerebral. Para ello, es necesario que las NPC expresen en su superficie integrinas que reconozcan moléculas de adhesión expresadas en las células endoteliales. El marcaje de NPC con anticuerpos específicos mostró que estas células expresan VLA4 (Fig. 41A), lo que asegura la posibilidad de interactuar con sus ligandos en los vasos sanguíneos que se encuentran en los alrededores de la lesión (Fig. 41B).

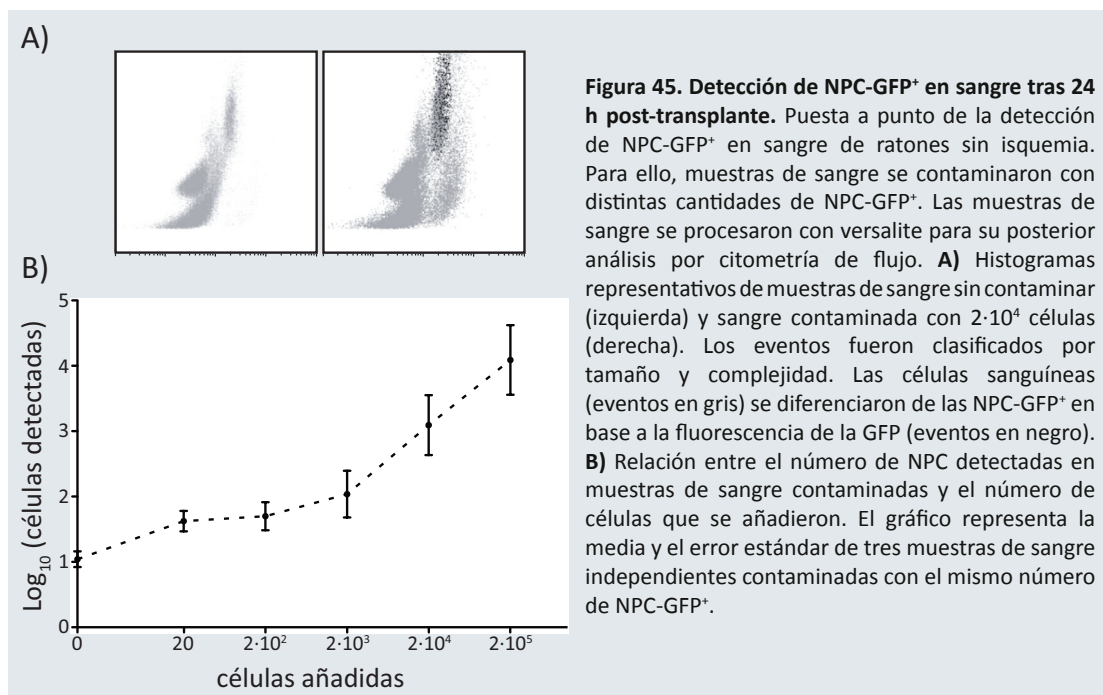
Se indujo isquemia cerebral en ratones C57BL/6 y tres días post-isquemia, se inyectaron vía intravenosa $5 \cdot 10^6$ células NPC-GFP⁺ aisladas de embriones (E14,5) transgénicos para GFP. La llegada de las células a la lesión se evaluó a distintos tiempos, según indicaba la bibliografía (Bacigaluppi et al., 2009). El estudio de la llegada de las células se realizó por dos técnicas distintas en paralelo, análisis por citometría de flujo de homogeneizados de tejido nervioso, y por análisis histológico mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 42).

Este análisis requirió de la obtención de un homogeneizado de tejido mediante digestión enzimática, seguido de disgregación mecánica del tejido con lesión del **hemisferio ipsilateral** y de la región equivalente en el **hemisferio contralateral** (como control) en cada ratón. Dado que, según los datos de la bibliografía, esperábamos un bajo número de NPC, evaluamos si el método era suficientemente sensible (Bacigaluppi et al., 2009). Para ello, contaminamos el

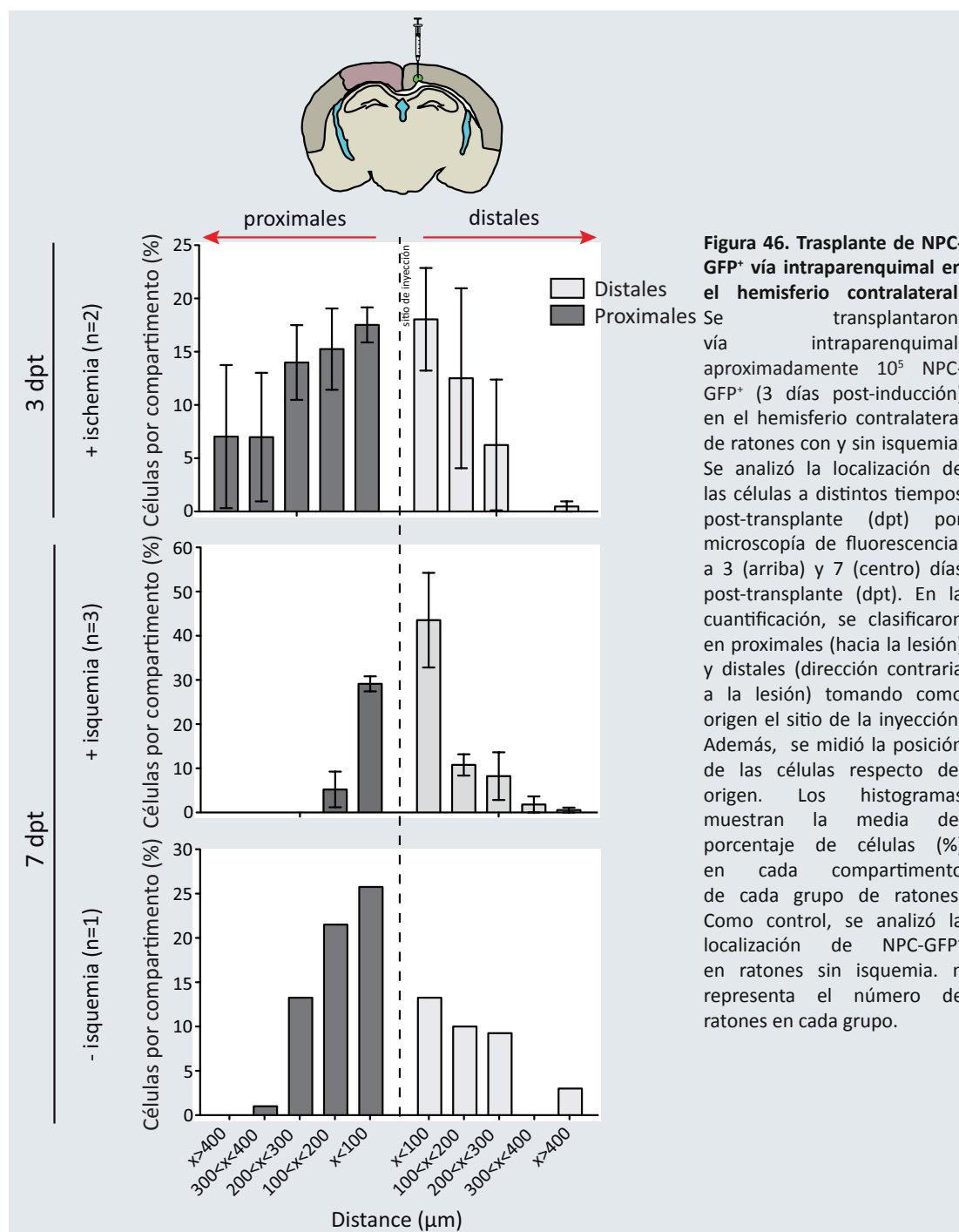


homogeneizado de tejido infartado con diluciones seriadas de NPC-GFP⁺, sometidas al proceso de homogenización, en paralelo, y evaluamos por citometría su presencia. El método demostró que la homogenización no afectó a la viabilidad de las células y que es posible detectar NPC-GFP⁺ incluso en condiciones de gran dilución (Fig. 43).

A continuación, se indujo isquemia cerebral en ratones C57BL/6 y tres días post-isquemia se inyectaron $5 \cdot 10^6$ células NPC-GFP⁺, evaluando la llegada de las células a la lesión



a distintos tiempos post-transplante. En ninguno de los tiempos analizados se detectaron NPC-GFP⁺ en el tejido cerebral con isquemia o control, tanto por citometría de flujo (Fig. 44) como por microscopía (datos no mostrados). Es posible que las NPC en sangre presenten una viabilidad reducida o que las células no lleguen a la lesión. Analizamos entonces la presencia de NPC en sangre 24 h tras el transplante vía intravenosa de $5 \cdot 10^6$ células NPC-GFP⁺ en ratones sin isquemia, y se analizaron las muestras de sangre por citometría de flujo. Para ello, se contaminaron muestras de sangre con diluciones seriadas de NPC-GFP⁺ y se procesaron para su detección por citometría (Fig. 45A, B). El procesamiento de las muestras de sangre no afectó



a la viabilidad de NPC, permitiéndonos detectar en sangre cantidades muy pequeñas de NPC-GFP⁺ (Fig. 45B). Sin embargo, al evaluar su presencia en sangre 24 h tras el transplante, no

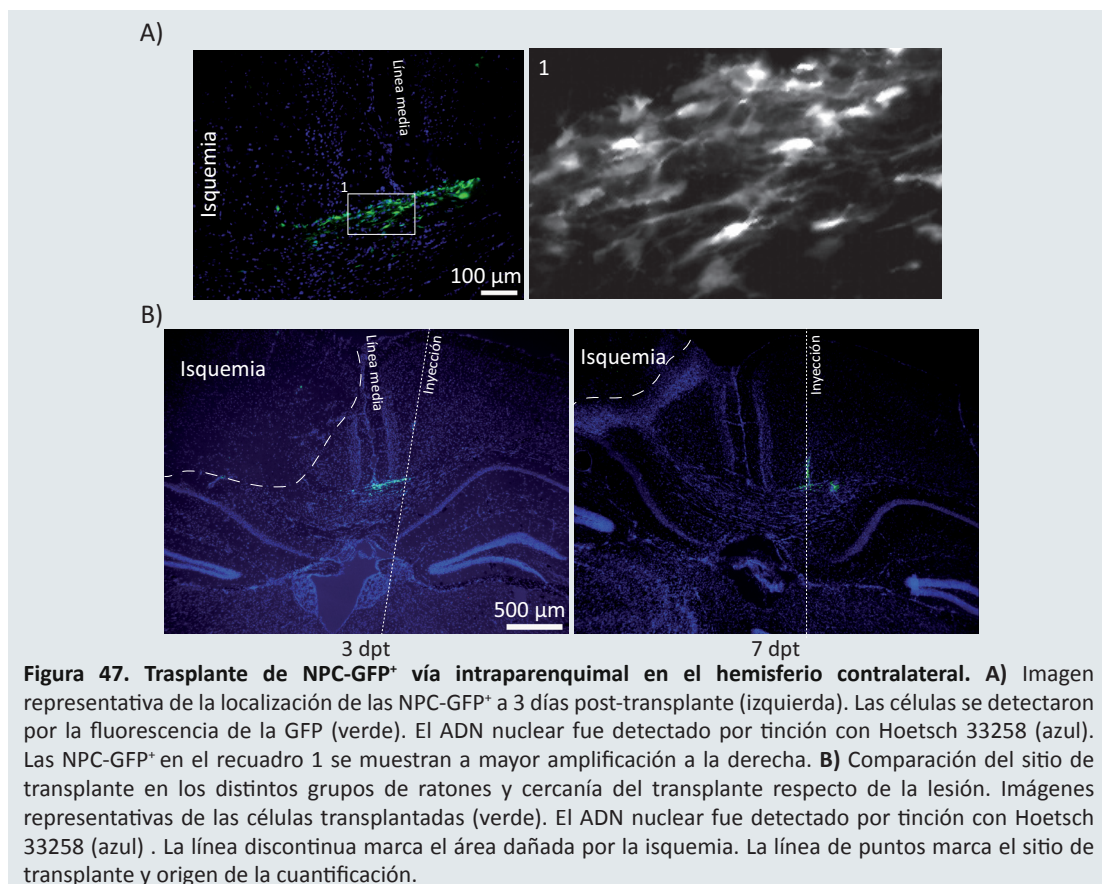
se detectó ninguna NPC-GFP⁺ (datos no mostrados) en ninguno de los ratones tranplantados, probablemente las células quedasen retenidas en algún tejido (pulmón, hígado, y/o riñón).

La imposibilidad de detectar las células del transplante en la lesión cuando éstas fueron administradas vía intravenosa hizo que nos planteáramos otras vías alternativas, como la inyección intraparenquimal.

4.7.1.2.- Vía intraparenquimal.

En este método, el transplante de células se hace directamente en el parénquima del cerebro. Así, las células tranplantadas migran desde el sitio del transplante a la zona isquémica en respuesta al gradiente quimiotáctico. Para ello, depositamos las células en dos localizaciones diferentes:

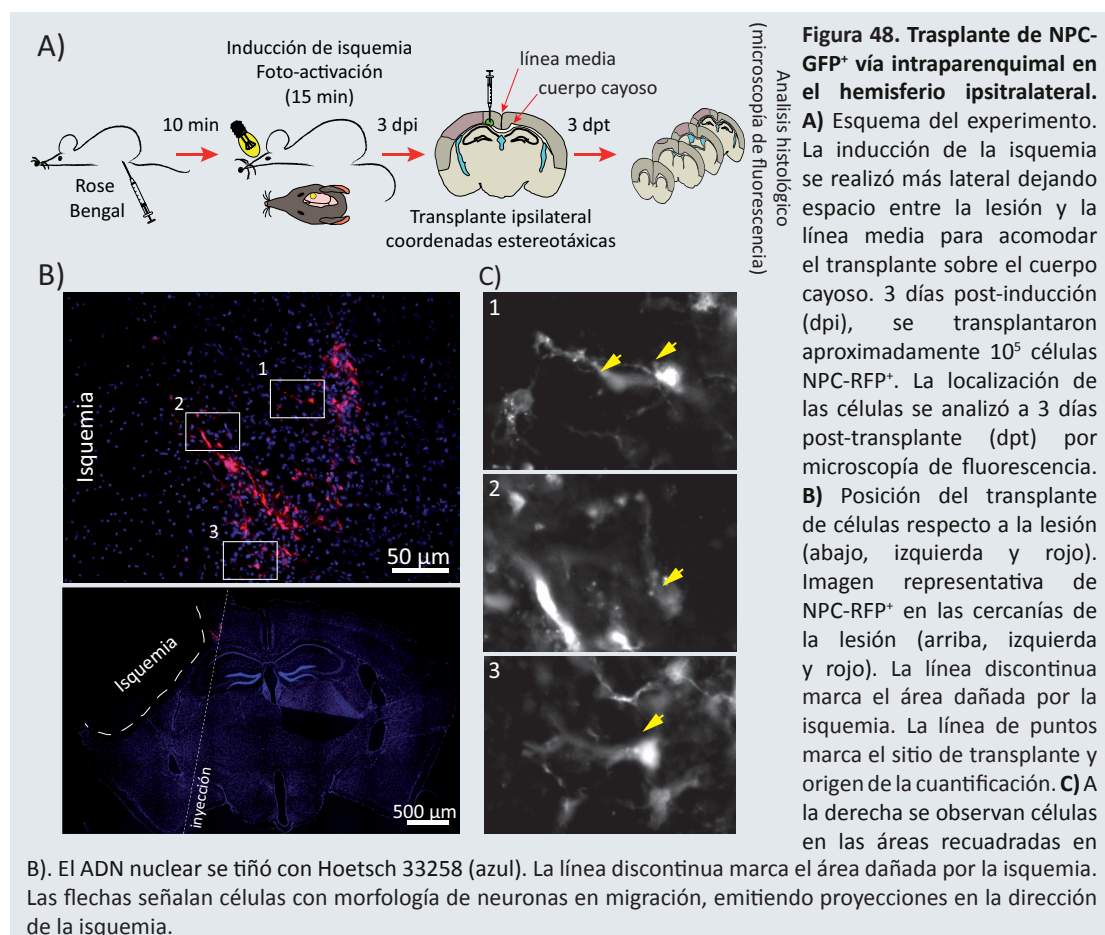
Transplante contralateral: Las células se transplantaron en el cuerpo cayoso del **hemisferio contralateral**, ya que esta estructura conecta los dos hemisferios y, por tanto, facilita la migración desde el hemisferio contralateral al **ipsilateral**. Para ello, se transplantaron 10⁵ NPC-GFP⁺ (**bregma** -2,06 mm, -1 mm lateral, 1 mm profundidad) en el hemisferio contralateral de ratones con isquemia (tres días post-inducción).



La evaluación de la migración se realizó por microscopía de fluorescencia en secciones de cerebro de ratón en las inmediaciones de las coordenadas fijadas. Una vez encontrado el sitio del transplante en el hemisferio contralateral, se observó que, en ratones con isquemia,

la distribución de células a ambos lados del sitio la inyección es la misma (Fig. 46). A tres días post-transplante se observó un mayor número de células en la dirección de la lesión y, además, mostraban un fenotipo migratorio. En este grupo de ratones, el sitio de la inyección estaba desplazado aproximadamente 500 μm hacia la lesión respecto las coordenadas fijadas (Fig. 47). Esto nos indujo a pensar que quizá la cercanía del sitio de inyección a la lesión fuese importante para favorecer la migración, debido a una mayor proximidad a la fuente del quimiotrayente.

Transplante ipsilateral: Tratamos de acercar el sitio de transplante a la zona de la lesión evitando así la pérdida del gradiente quimioatractivo por la distancia. Para ello, modificamos la posición de la lesión, haciéndola más lateral, dejando hueco para el transplante en el mismo hemisferio (Fig 48A). Así, 10^5 células NPC-RFP⁺ se transplantaron en las coordenadas (**bregma** -2,06 mm, 0,5 mm lateral, 1 mm profundidad), analizándose la localización de las células a los 3 días post-transplante. Como se puede observar, en estas condiciones, las células se mueven y se orientan hacia la lesión. Además, presentan morfología polarizada emitiendo proyecciones de membrana dirigidas hacia la zona dañada (Fig. 48B).



Quisimos analizar entonces el papel de p110 β en la migración de NPC inducida en situación de isquemia. Para ello, se transplantaron (tres días post-isquemia) ratones con una mezcla de NPC wt y deficientes en p110 β en una relación (1:1) en posición ipsilateral (Fig. 49A). Las células utilizadas se nucleofectaron como en los experimentos de migración *in vitro*

con una mezcla de shRNA-p110 β y pEGFP. Como control, se utilizaron NPC aisladas de ratón transgénico para la proteína roja fluorescente (RFP, del inglés “red fluorescent protein”), crecidas como neuroesferas y electroporadas con shRNA-control (Fig. 49A). Las NPC-RFP responden a la quimioquina de la misma manera que lo hacen las NPC-Wt. 36 h después de la nucleofección, las neuroesferas se disgregaron y se preparó una mezcla de NPC-RFP-shRNA control y NPC-GFP-shRNA-p110 β . Por citometría de flujo, se comprobó que la mezcla de células estuviese compuesta por el mismo número de células RFP⁺ que de GFP⁺ (Fig. 49B).

Tres días después del trasplante, se estudió la localización de las células por inmunofluorescencia en secciones de cerebro. Los resultados demostraron que no había

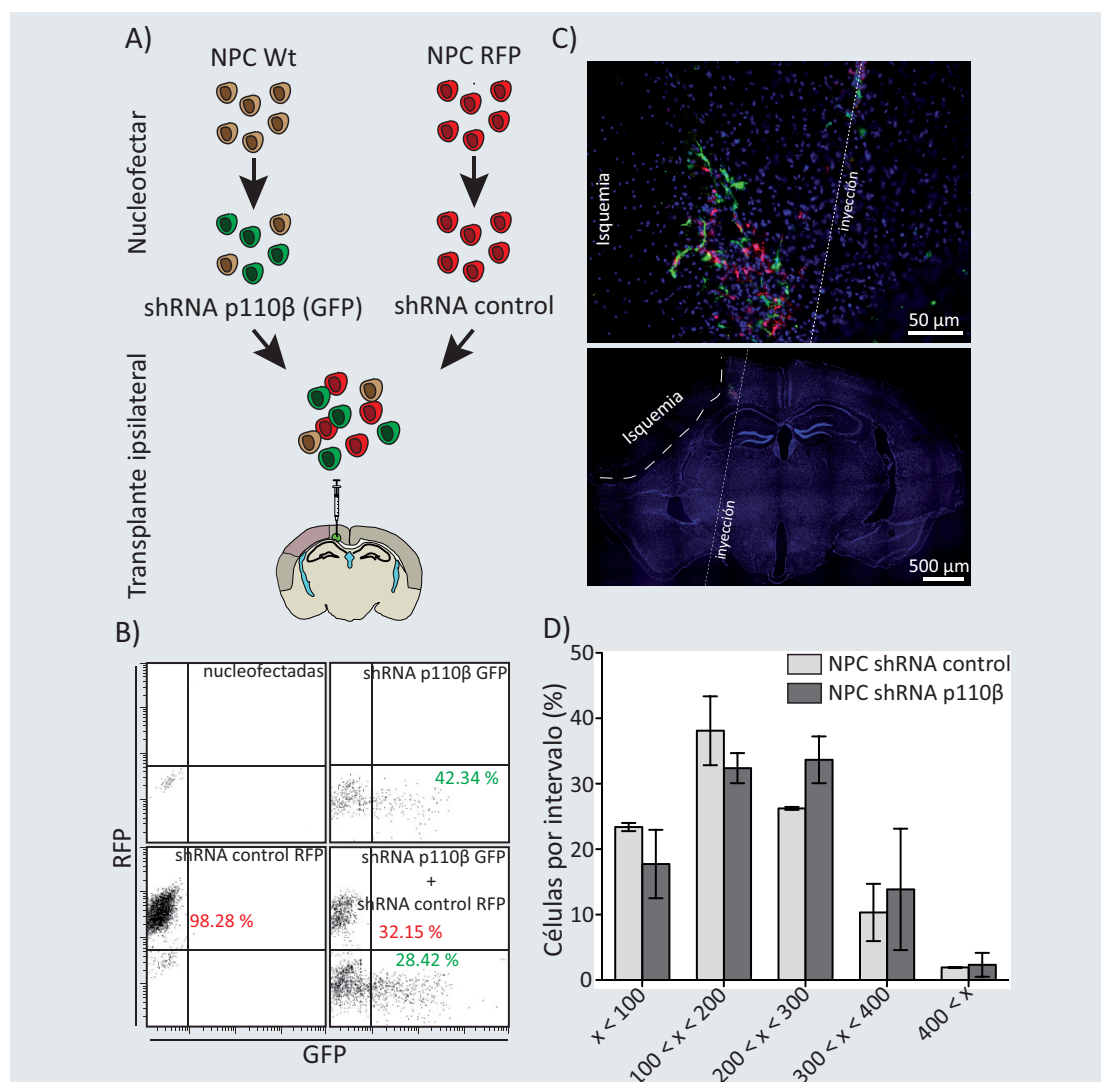
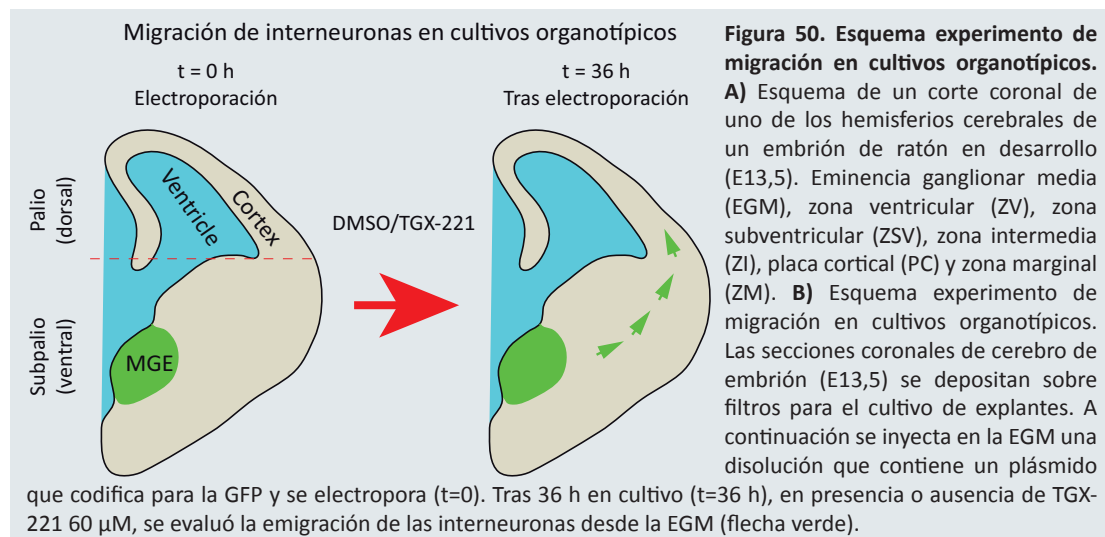


Figura 49. Evaluación del papel de p110 β en la migración de NPC hacia la zona infartada. **A)** Se nucleofectaron por separado NPC Wt (con la mezcla shRNA p110 β + pEGFP) y NPC RFP⁺ (con shRNA control). 36 h tras la nucleofección se mezclaron de forma que tuviésemos RFP:GFP (1:1). La mezcla de células se transplantó en ratones con isquemia (3 días post-inducción). La posición de las células se analizó 3 días post-transplante (dpt) por microscopía de fluorescencia. **B)** Por citometría de flujo se comprobó que la mezcla de células para el trasplante tenía la misma cantidad de células RFP⁺ que GFP⁺ (abajo, derecha). Arriba y derecha, se muestra la eficiencia de nucleofección en las células NPC shRNA p110 β . Abajo e izquierda, se muestra la fluorescencia de las NPC RFP⁺ nucleofectadas con el shRNA control. Como control negativo se utilizaron NPC Wt nucleofectadas con shRNA control. **C)** Análisis de la posición relativa de las células NPC shRNA p110 β (verdes) respecto de las NPC shRNA-control (rojo) (arriba). Posición del sitio del trasplante respecto de la lesión (abajo). La línea discontinua marca el área dañada por la isquemia. La línea de puntos marca el sitio de trasplante y origen de la cuantificación. **D)** Cuantificación del número de células en cada compartimento respecto al sitio de inyección. Las barras muestran la media y error estándar de dos ratones distintos.

diferencias en términos de migración entre las NPC-GFP-shRNA-p110 β y las NPC-RFP-shRNA control. Es muy probable que el tiempo necesario para la evaluación de las células no sea compatible con el tiempo en el que el silenciamiento es efectivo o que la eficiencia de la nucleofección no haya sido suficiente como para que el efecto sea evidente. La dificultad en coordinar esas cinéticas, la variabilidad entre animales y el bajo número de células obtenido tras la electroporación, nos hizo buscar otros modelos donde analizar el efecto de p110 β sobre la migración de progenitores neurales.

4.7.2.- Modelo de invasión de la corteza cerebral por interneuronas originadas en la eminencia ganglionar media (EGM).

La corteza cerebral se origina por la llegada de distintos tipos de neuronas a la PC. Por un lado, las **neuronas de proyección** que migran radialmente desde la zona neurogénica dorsal (en contacto con los **ventrículos**) (Fig. 3). Por otro lado, y de manera coordinada con



ellas, llegan a la PC las **interneuronas** que se originan en la EGM (Fig. 3). Las eminencias ganglionares se encuentran en el **subpalio**, con lo que las interneuronas migran tangencialmente hasta la corteza. Se sabe que CXCL12 se expresa en la corteza cerebral, a lo largo de la ruta de migración seguida por las interneuronas (Daniel et al., 2005; Stumm et al., 2007; Tham et al., 2001; Tissir et al., 2004), y parece que juega un papel importante limitando su movimiento a lo largo de la ZI/ZSV y la ZM, evitando así, la invasión prematura de la PC por las interneuronas (Fig 3).

El modelo utilizado de invasión de la corteza por interneuronas en cultivos organotípicos, es un modelo pseudo *in vivo*, desde el punto de vista de la metodología empleada. En estos experimentos se realizan cortes coronales de cerebro de ratón en el estadio en el que empiezan a originarse interneuronas en la EGM (E13,5). Estas secciones se colocan en cultivo de forma que las interneuronas completen su migración *ex vivo*, pero el contexto en el que se produce la migración es el mismo que el que se produciría *in vivo*. Una vez puestas las secciones en cultivo, se electroporaron las células de la EGM con un plásmido que expresa la proteína GFP (t = 0 h) (Fig. 50B, izquierda) para facilitar su seguimiento desde la EGM hasta la corteza (Fig. 50B, derecha). Dado que, *in vitro*, el inhibidor químico demostró ser muy específico de p110 β ,

realizamos cultivos organotípicos de secciones de ratón de E13,5 en presencia o ausencia de TGX-221. El inhibidor se añadía en el $t = 0$ h y los resultados se analizaron 36 h después (Fig 50B, derecha). En las secciones control, después de 36 h en cultivo, se observó que las interneuronas abandonan la EGM para dirigirse hacia la corteza (Fig. 51A, izquierda).

Además, estas células se encuentran polarizadas, con una o varias proyecciones de membrana en el frente de avance y el núcleo en la parte trasera, mostrando la morfología típica de precursores neuronales en migración (Fig. 51B). Es de destacar que la mayoría de las células estaban orientadas hacia la corteza cerebral. El tratamiento de las secciones con TGX-221 60 μ M mostró un bloqueo completo de la migración de las células de la EGM hacia la corteza (Fig 51. A, derecha). Este defecto se debe a bloqueo en la migración y no a defectos en la

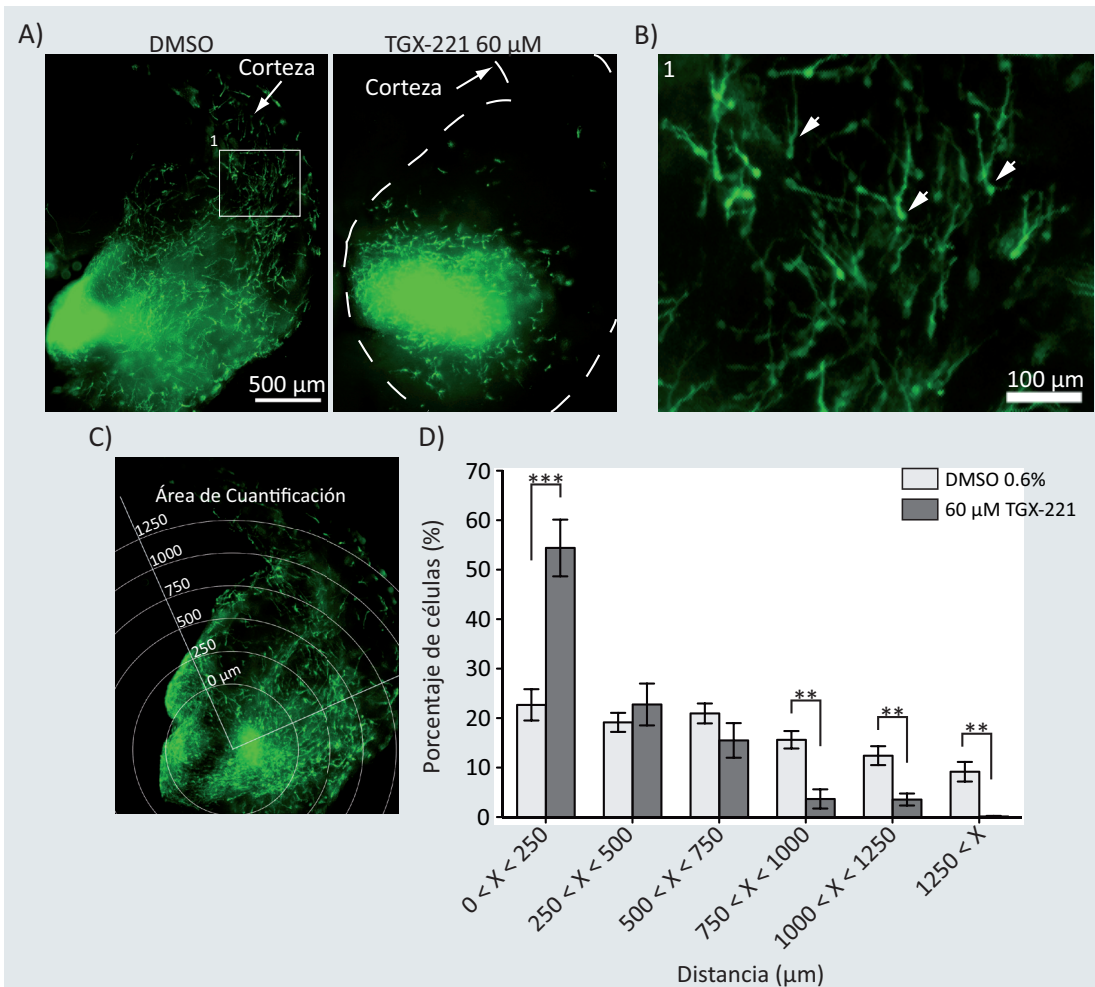


Figura 51. Papel de p110 β en la migración de precursores neuronales en cultivos organotípicos. **A)** Imágenes representativas de secciones coronales a 36h en cultivo tras la electroporación con pCAGGS-GFP. El cultivo de las secciones se realizó en presencia de TGX-221 60 μ M (derecha) o DMSO 0,6% como control (izquierda). Las interneuronas se reconocen por la expresión de GFP. **B)** Imagen de mayor ampliación del área recuadrada en A), recuadro 1. Se observa que todas las células se encuentran polarizadas con la morfología típica de interneuronas en migración. Las flechas señalan células con el frente de avance en la dirección de la corteza cerebral. **C)** Gradilla calibrada de circunferencias concéntricas (radio creciente cada 250 μ m) utilizada para la cuantificación de la migración. La circunferencia de menor tamaño (0 μ m) contiene el agregado de células electroporadas en la EGM y no se cuantificó. En la cuantificación sólo se consideró el cuadrante que estaba dirigido hacia la corteza cerebral por ser la dirección que presentan las interneuronas en la migración tangencial. **D)** Cuantificación del número de células (%) en cada compartimento en secciones tratadas con DMSO 0,6 % o TGX-221 60 μ M. Las barras muestran la media y el error estándar de cada compartimento en las distintas secciones (DMSO n=7, TGX-221 n=8). La significación estadística (*) se determinó mediante la prueba t de student siendo. **P < 0,01; ***P < 0,001. La línea discontinua marca el borde del corte cerebral (A, panel derecho).

viabilidad de estas células, ya que no se apreciaron diferencias en este sentido con respecto a las células no tratadas (datos no mostrados). Para la cuantificación de las imágenes se utilizó una gradilla calibrada y se contaron el número de células dentro de cada compartimento (Fig. 51C, izquierda). Los resultados indican que el bloqueo de p110 β provocó una acumulación de células muy significativa en los compartimentos cercanos a la zona electroporada (Fig. 51C, izquierda). Concluyéndose, que la inhibición de p110 β impide la migración de las interneuronas hacia la corteza (Fig. 51C, izquierda).

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

Durante la embriogénesis juega un papel crítico el movimiento celular. Multitud de tipos celulares se mueven coordinadamente a lugares, incluso muy alejados para, culminar la generación de los distintos órganos que constituyen el organismo. Por ejemplo, los progenitores hematopoyéticos durante el desarrollo se localizan en tejidos extra embrionarios (saco vitelino) en estadios más tempranos (Cumano et al., 1996), en el hígado (Moore and Metcalf, 1970) en estadios más avanzados y, finalmente, en la médula ósea. Más complejo aún resulta el desarrollo del SNC y SNP (Sistema Nervioso Periférico), donde el movimiento celular es, de nuevo, crítico para formar, por ejemplo, las distintas capas del cerebelo (Tiveron and Cremer, 2008), la laminación de la corteza cerebral (Rakic, 2009) y la formación del giro dentado del hipocampo (Lu et al., 2002). Pero la complejidad del sistema nervioso no queda ahí. Una vez las células alcanzan su posición final, emiten neuritas para establecer las conexiones sinápticas apropiadas con otras neuronas, a veces incluso, en localizaciones distantes gracias al crecimiento axonal, proceso que, por otro lado, tiene gran semejanza con la migración celular (Lin and Holt, 2007). Tanto la migración neuronal como el crecimiento axonal, están finamente regulados por la acción de varias proteínas, que actúan como quimiorrepelentes o quimioatrayentes. Por lo tanto, una migración neuronal defectuosa tiene dramáticas consecuencias en la conectividad de sistema nervioso que afectan al correcto funcionamiento del mismo. Defectos en la migración del SNC produce heterotopías con severas alteraciones funcionales para el organismo, en el caso de que se complete el desarrollo, como por ejemplo: retraso mental, ataques epilépticos, trastorno bipolar o esquizofrenia (Di Cristo, 2007; Kerjan and Gleeson, 2007; Manent et al., 2009; Valiente and Marin, 2010).

El descubrimiento de la **neurogénesis**, en el adulto, suscitó grandes expectativas en los procesos de autoreparación en el sistema nervioso central, aunque hoy día se sabe que su función es más homeostática, restringida mayoritariamente a la regeneración de **interneuronas** en el bulbo olfatorio y en el giro dentado del hipocampo, siendo importante para la correcta función de estas estructuras (Ihrle and Alvarez-Buylla, 2011; Ming and Song, 2011). Sin embargo, ante un daño cerebral, se produce una activación de las zonas neurogénicas y la migración de precursores hacia la zona dañada (Arvidsson et al., 2002; Thored et al., 2006), aunque el número de neuronas que completan su diferenciación y se integran, para sustituir las células

perdidas tras la daño, es normalmente insuficiente (Bacigaluppi et al., 2008; Bliss et al., 2007).

Cada vez son más los factores implicados en la migración de precursores neuronales, aunque todavía no son bien conocidos los mecanismos moleculares subyacentes que conectan los quimioatrayentes con la activación de la maquinaria necesaria para el movimiento celular. Gran parte de las rutas de señalización necesarias para la migración se conocen por extrapolación de lo que ocurre en células del sistema inmunológico, donde han sido extensamente estudiadas y definidas. Pero, nada se conoce sobre si algunas rutas se activan específicamente en uno u otro tipo celular. De hecho, incluso en las propias células inmunológicas, factores necesarios en algunos casos, no lo son en otros. Por ejemplo, células T deficientes en la subunidad catalítica de PI3K p110 γ muestran migración defectuosa dependiendo del quimioatrayente (Martin et al., 2008). Es, pues, necesario profundizar en los mecanismos moleculares que gobiernan la migración neuronal, para poder diseñar nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de distintas enfermedades del SNC.

5.1.- Aislamiento y Cultivo de Neuroesferas.

En este proyecto hemos utilizado NPC, que son células capaces de autorrenovarse y diferenciarse, ya que su papel es crucial para el mantenimiento de la homeostasis tisular y para activar, cuando sea preciso, los mecanismos de reparación y regeneración tras un daño. Su localización en zonas dañadas, junto a estas características, les confiere un alto potencial terapéutico.

Todavía no se conocen marcadores específicos de NSC, por lo que se utiliza un criterio funcional para definirlos (Ihrie and Alvarez-Buylla, 2011; Pastrana et al., 2011). Así, se identifican como células madre las que, cultivadas a densidad clonal, forman neuroesferas. Estas células cumplen con la propiedad de **autorrenovación**, ya que tienen capacidad de formar nuevas neuroesferas, y **multipotencia**, ya que pueden diferenciarse a distintos tipos celulares.

Así, las neuroesferas constituyen una fuente de NPC en cultivo estable que se puede utilizar durante varios pases. Sin embargo, aunque las condiciones del cultivo de neuroesferas son específicas para el enriquecimiento de NPC, no permite disponer de una población celular uniforme. Al igual que ocurre *in vivo*, las NSC al dividirse van a dar lugar a células amplificadoras intermedias (células progenitoras) y éstas, a su vez, dan lugar a neuroblastos, los cuales completan su diferenciación a neuronas. Muchos de los marcadores utilizados en la purificación de estas poblaciones son comunes a varios tipos celulares (células madre, progenitores y precursores) (Ihrie and Alvarez-Buylla, 2011; Pastrana et al., 2011). Además, la diferenciación espontánea entre estos tipos celulares hace que las neuroesferas estén compuestas siempre por una mezcla de células, incluso cuando se ha partido de una población inicial purificada (Reynolds and Rietze, 2005). También es difícil calcular el porcentaje de cada uno de los tipos celulares que constituyen las neuroesferas, y como estos porcentajes pueden verse alterados por diferencias entre el estadio embrionario fuente de NPC, condiciones y tiempo del cultivo, por lo que, de hecho, pueden encontrarse algunas variaciones al analizar distintos trabajos publicados (Barnabe-Heider et al., 2005; Qian et al., 2000; Tran et al., 2004; Vicario-

Abejon et al., 2003). Las neuroesferas que hemos empleado en este trabajo están compuestas por un alto porcentaje de células indiferenciadas, como demuestra el marcaje con nestina, proteína de la familia de los filamentos intermedios que se expresa en todos los tipos de NPC (NSC, progenitores y precursores). En neuroesferas primarias (7 días en cultivo) observamos un pequeño porcentaje de neuronas, cuyo origen podría ser neuronas formadas de *novo*, como consecuencia de la diferenciación terminal de las NPC presentes en la población, o neuronas procedentes del tejido embrionario, que sobrevivieron en cultivo gracias a factores secretados por las NPC.

En ningún caso se encontraron astrocitos maduros en los cultivos de neuroesferas. Esto podría deberse a que durante el desarrollo embrionario la neurogénesis y la **gliogénesis** tienen lugar de forma secuencial. En estadios tempranos, entre E11 y E18, se produce la neurogénesis, lo que permite establecimiento de las conexiones neuronales en un medio libre de otros tipos celulares (Miller and Gauthier, 2007). Aproximadamente a E18, cambia la potencialidad de las NPC y se generan células de glía: astrocitos, entre E18 y la primera semana postnatal, y oligodendrocitos, en la primera semana post-natal (Ihrie and Alvarez-Buylla, 2011; Miller and Gauthier, 2007; Spassky et al., 2005). Esta separación entre neurogénesis y gliogénesis, permite que las células de glía se distribuyan por el SNC para interactuar con los circuitos neuronales ya existentes. Esta transición también se da *in vitro*, ya que, en experimentos de diferenciación de NPC, se generan siempre primero neuronas, después astrocitos y por último oligodendrocitos (Barnabe-Heider et al., 2005; Qian et al., 2000). Experimentos de diferenciación de NPC obtenidas de distintos estadios embrionarios, cultivadas en las mismas condiciones, muestran que la relación neuronas/glía va disminuyendo según las NPC derivan de embriones de estadios más tardíos (Qian et al., 2000). Lo que resalta la existencia de un programa genético que promueve la neurogénesis, evitando la gliogénesis, como es la expresión de factores de transcripción de la familia bHLH (del inglés “basic helix loop helix”) (Nieto et al., 2001) y modificaciones epigenéticas que bloquean la expresión de genes pro-gliogénicos (Fan et al., 2005; Namihira et al., 2004; Takizawa et al., 2001). Sin embargo, el ambiente extracelular es importante. El trasplante de NPC derivadas de estadios neurogénicos transplantadas en secciones de cerebro embrionarios, se diferencian a neuronas; mientras que, si el trasplante se realiza en secciones de cerebros post-natales, se diferencian a células gliales (Morrow et al., 2001). Las neuronas que se generan durante el desarrollo secretan al medio una citoquina gliogénica, CT-1 (cardiotrofina-1) que es imprescindible para que se produzca el cambio neurogénesis-gliogénesis. Así, las propias neuronas regularían la potencialidad de las NPC, no induciéndose el comienzo de la gliogénesis hasta que el número de neuronas sea adecuado (Barnabe-Heider et al., 2005).

En nuestros experimentos con neuroesferas derivadas de embriones E11,5, el porcentaje de neuronas es bajo en comparación con cultivos derivados de E14,5, lo que se explica porque a estadios tan tempranos, las NPC se dividen mayoritariamente por división simétrica para aumentar su número antes de comenzar la neurogénesis (Qian et al., 2000).

En cuanto a los experimentos de diferenciación, en nuestras condiciones, las NPC mantienen sus propiedades multipotentes, ya que son capaces de diferenciarse tanto a células

de linaje neural como glial. El hecho de que se trabaje con una mezcla de progenitores y que no sea posible trabajar con una población homogénea, está poniendo en discusión la **multipotencia** de las NPC *in vivo* (Ming and Song, 2011; Pastrana et al., 2011). Podría ocurrir que existieran en el cerebro distintos tipos de NSC con distinto potencial, unas neurogénicas y otras gliogénicas que se activasen en distinta ventana temporal durante el desarrollo. Sin embargo, en estudios a nivel clonal sobre la progenie celular de NPC muestran que, al menos *in vitro*, neuronas y glía derivan de una misma célula (Qian et al., 2000).

5.2.- Estudio de la Motilidad de NPC.

Las NPC tienen una alta capacidad migratoria, y es el balance entre quimioatrayentes y quimiorrepelentes a los que se encuentran expuestas, lo que establece la direccionalidad del movimiento celular *in vivo*. Entre aquellas moléculas con actividad quimioatrayente y/o motogénica se encuentran Nrg1, CXCL12, HGF, FGF2, BDNF y NT4. La unión de dichas moléculas a su correspondiente receptor en la superficie celular, inicia la señalización necesaria para que el citoesqueleto se remodele produciendo movimiento celular. Aunque son muchos los estímulos, dado que el efecto final es siempre promover la migración, podemos suponer que muchas de las señales intracelulares son comunes a todos. Sin embargo, es también lógico pensar que existirán cascadas de señalización específicas de cada ligando e incluso del tipo celular. De hecho, este es el caso de las células del sistema inmunológico, donde, por ejemplo, PI3K γ es esencial para el movimiento de neutrófilos dirigido por las quimioquinas, mientras es prescindible para el mismo estímulo en células T. El estudio de la señalización asociada al movimiento neuronal ha sido poco abordado y, sin embargo, es un punto clave para el diseño de nuevas aproximaciones terapéuticas a las enfermedades del SNC.

La quimioquina CXCL12 juega un papel importante promoviendo la migración de NPC durante el desarrollo embrionario (Borrell and Marin, 2006; Klein et al., 2001; Lu et al., 2002; Tiveron et al., 2006) y también en el adulto, donde CXCL12 regula la localización de NPC en la ZSV y actúa como **factor motogénico** de los neuroblastos facilitando su migración hacia el bulbo olfatorio (Kokovay et al., 2010). Dado el potente papel como quimioatrayente que presenta sobre determinados tipos de NPC durante el desarrollo (Klein et al., 2001; Li et al., 2008; Stumm et al., 2003; Wang et al., 2011; Zhu et al., 2002), no es de extrañar que el SNC se haya reservado la inducción de la expresión de CXCL12 en situaciones de daño cerebral como mecanismo de atracción de NPC a la lesión, para poder así participar en los mecanismos de reparación tisular en el adulto. En esta línea, son muchos los trabajos que muestran que la función de CXCL12 difiere de la de otras quimioquinas, en cuanto a que no es una quimioquina inducible en inflamación, sino que tiene un papel homeostático en el organismo (Mithal et al., 2012). De hecho, se piensa que CXCL12 es una quimioquina ancestral (Huisin et al., 2003), evolutivamente, cuyo papel original es dirigir la migración durante el desarrollo embrionario (Mithal et al., 2012), lo que se confirma con el elevado número de alteraciones que presenta el ratón deficiente en CXCL12 en diversos tejidos, entre los que se encuentra el SNC (Ma et al., 1998; Nagasawa et al., 1996; Stumm et al., 2003). Es por esta razón que elegimos CXCL12 como modelo de migración *in vitro*.

5.2.1.- Elección del medio de migración.

El cultivo de NPC se hace en presencia de EGF y FGF como factores de proliferación y supervivencia (Rietze and Reynolds, 2006). Sin embargo, su presencia en los ensayos de migración a la concentración utilizada en el cultivo de neuroesferas impedía la migración (Fig. 18 E, F y Fig. 22 D). Se sabe que varios factores de crecimiento actúan como **factores motogénicos** (HGF, BDNF, EGF, FGF) y/o quimioatrayentes en varios tipos celulares como fibroblastos (Ellis et al., 2007; Xie et al., 1998) y células cancerígenas (Price et al., 1999). De hecho, HGF ejerce una función importante durante el desarrollo del SNC estimulando la motilidad de NPC, lo que las hace competentes para responder a las moléculas guía que van a regular la direccionalidad de la migración (Flames et al., 2004; Powell et al., 2001). En nuestro caso, altas dosis de factores de crecimiento interferían en la migración promovida por CXCL12, sin embargo, a dosis bajas, la supervivencia de las células se mantiene durante los ensayos (Fig. 16) y, además, las células responden a CXCL12 en los ensayos de migración (Fig. 18 C, D y Fig. 23 A). Con lo que a bajas dosis de factores de crecimiento, es posible que EGF y FGF ejerzan un efecto motogénico sobre NPC. Por otro lado, a altas concentraciones, estos factores de crecimiento podrían activar alguna ruta de señalización que interfiera con las activadas por la quimioquina, o que la célula bloquee su capacidad migratoria mientras su programa de proliferación está activado.

5.2.2.- Estudio de la Motilidad por Videomicroscopía.

En el espacio intersticial, los factores de crecimiento y las quimioquinas son atrapados por la red de proteoglicanos que constituyen la matriz extracelular. De esta forma, la interacción de quimioquinas con los glicosaminoglicanos, disminuye su disponibilidad en forma soluble. En el caso de las células del sistema inmunológico, se sabe que sólo las quimioquinas asociadas a los glicosaminoglicanos promueven su movimiento *in vivo* (Jackson et al., 2005; Torres and Ramirez, 2009). Además, la interacción quimioquina-glicosaminoglicano puede hacer más eficiente la unión quimioquina-receptor modificando incluso la afinidad (Vega et al., 2011), lo que podría incluso afectar a la señalización intracelular. En los ensayos de migración en tiempo real, las NPC se desplazan por una matriz extracelular que contiene la quimioquina adherida de manera análoga a como ocurre en el organismo. Observamos que en NPC, procedentes de neuroesferas, todas las células presentan movimiento basal (Fig. 18 y Fig. 21). Esta situación no sucede *in vivo*, ya que no todos los tipos de NPC presentan motilidad. En concreto, las células madre y los progenitores se encuentran siempre en el nicho neurogénico, intercaladas con las células endoteliales o interactuando con los capilares de la ZSV, respectivamente (Ihrle and Alvarez-Buylla, 2011; Merkle and Alvarez-Buylla, 2006). Sin embargo, los neuroblastos abandonan el nicho para dirigirse a su destino donde luego se diferencian (Ming and Song, 2011). Esto, debe atribuirse a la gran diferencia que existe entre la situación *in vivo* y los modelos *in vitro*, tanto a nivel estructural como de composición. La ausencia de uniones intercelulares debido a la baja densidad celular a la que se realizan los experimentos *in vitro* podría, también, contribuir a las diferencias observadas.

En los experimentos de videomicroscopía observamos un movimiento no dirigido de

las NPC en ausencia y presencia de CXCL12, debido a que en estos experimentos no existe gradiente quimiotáctico. Sin embargo, la quimioquina promueve un aumento de la motilidad celular aumentando la velocidad media (Fig 18 C). Es decir, además de su papel descrito como quimioatrayente, nuestros resultados muestran que CXCL12 tiene un papel **motogénico** en NPC. Igual sucede en la ZSV donde CXCL12 tiene diferente efecto según el tipo de NPC. En concreto, el CXCL12, expresado por las células endoteliales de la ZSV, actúa como quimioatrayente en células de tipo B activadas en la ZV, permitiendo su interacción con los capilares de la ZSV y facilitando así el acceso a factores secretados por las células endoteliales y que regulan su proliferación (Kokovay et al., 2010). Sin embargo, en los neuroblastos subventriculares, CXCL12 hace que la interacción célula-lámina basal de los vasos sanguíneos no sea tan estrecha como en el caso de células de tipo B y C, estableciendo un estado competente que favorece la migración en cadenas de neuroblastos por los vasos de la ZSV hacia el bulbo olfatorio (Kokovay et al., 2010). Por otro lado, en experimentos *in vitro*, en los que se enfrentan explantes de EGM con agregados células que expresan o no la quimioquina, además del efecto quimioatrayente, CXCL12 induce un aumento de la velocidad de las células que abandonan el explante (0,267 $\mu\text{m}/\text{min}$ sin quimioquina, 0,367 $\mu\text{m}/\text{min}$ con quimioquina) (Lysko et al., 2011). El efecto motogénico se ha observado también en cultivos organotípicos, donde las interneuronas presentan mayor velocidad media en aquellas regiones de la corteza donde la concentración de quimioquina es mayor (0,783 $\mu\text{m}/\text{min}$ a baja concentración (zona dorsal de la corteza); 0,883 $\mu\text{m}/\text{min}$, a alta concentración frontera palio-subpalio) (Lysko et al., 2011).

Las diferencias encontradas en las velocidades medias de los NPC entre nuestros resultados y los encontrados en la bibliografía, son explicables por las distintas condiciones ambientales que rodean a las células en un tipo de ensayo u otro. Mientras que en nuestros ensayos la células se desplazan por una superficie, en los ensayos de cultivos organotípicos, el desplazamiento de las células es por una matriz tridimensional. El mayor número de interacciones que establece una célula en su movimiento por una matriz tridimensional, puede explicar que el movimiento de las NPC sea más lento que su movimiento por una superficie (1,645 \pm 0,058 $\mu\text{m}/\text{min}$ sin CXCL12 y 1,964 \pm 0,044 $\mu\text{m}/\text{min}$ con CXCL12 sobre superficies de fibronectina) y las diferencias morfológicas.

No podemos descartar que también influya la diferente composición del medio en cada sistema. En los ensayos bidimensionales, observamos que el movimiento celular es muy dependiente de la proteína de matriz extracelular empleada en el tapizado. Así, por ejemplo, en ausencia de CXCL12 la laminina estimula significativamente el movimiento (2,130 \pm 0,115 $\mu\text{m}/\text{min}$) de NPC en comparación a la fibronectina (1,137 \pm 0,047 $\mu\text{m}/\text{min}$). Esto pone de manifiesto, cómo el entorno puede afectar a la motilidad de estas células observándose parámetros cinemáticos diferentes según la proteína de matriz extracelular utilizada.

5.2.3.- Características Morfológicas de NPC en los Ensayos de Videomicroscopía.

En los experimentos de videomicroscopía detectamos, además, dos poblaciones celulares con comportamiento distinto (Fig. 21A). Uno, muy adherente con un movimiento de tipo fibroblástico o mesenquimal. Otro, menos adhesivo, que muestra un frente de avance

con mucha formación de **filopodios** y cuyo movimiento se produce a mayor velocidad media. Debido a que se sabe que las neuroesferas están compuestas por distintos tipos de NPC, estos patrones de migración diferentes observados podrían corresponder a distintos tipos celulares. La falta de marcadores específicos de los distintos tipos de NPC, así como la baja adherencia de las células redondeadas, dificulta su identificación. De entre los distintos tipos de NPC, son los neuroblastos los que muestran mayor motilidad *in vivo*, migrando hacia su destino final donde completar su diferenciación, tanto durante el desarrollo embrionario como en el ratón adulto. Esta capacidad la adquieren en parte por la expresión de moléculas de adhesión con modificaciones post-traduccionales especiales que alteran la afinidad de su interacción. En concreto, los neuroblastos expresan la forma de NCAM unida a ácido polisialílico (PSA) (Marin and Rubenstein, 2003). Debido a la elevada carga negativa de PSA son moléculas muy hidrofílicas, por lo que aumentan mucho el volumen estérico de NCAM, impidiendo interacciones intercelulares fuertes y consiguiendo un incremento de velocidad (Rutishauser, 2008). Un análisis sobre la expresión de PSA-NCAM en las células que componen las neuroesferas podría ayudar a conocer si las células que migran con mayor velocidad media se corresponden con las células que *in vivo* tienen mayor capacidad migratoria.

Por otro lado, y debido a la falta de tridimensionalidad del entorno en nuestros ensayos de migración, el patrón de migración observado difiere del patrón de migración que presentan las NPC en cultivos organotípicos, donde se mantiene la citoarquitectura y composición del ambiente *in vivo*. La migración neuronal tiene lugar mediante la extensión de una neurita, que va a constituir el frente de avance en la dirección al quimioatrayente (Ayala et al., 2007; Valiente and Marin, 2010). Una vez la neurita se estabiliza, se produce la translocación del núcleo. Es un mecanismo de migración a “saltos” donde el núcleo celular tiene fases de parada y de movimiento (Ayala et al., 2007; Valiente and Marin, 2010). Mientras que en nuestros ensayos, el desplazamiento nuclear es más o menos coincidente en el tiempo con la extensión del frente de avance.

5.3.- Mecanismos Moleculares Activados por CXCL12 en NPC.

5.3.1.- Activación del receptor: Papel de CXCR4 y CXCR7 en la migración de NPC.

Además del efecto **motogénico**, CXCL12 promueve la migración dirigida de las NPC, (Belmadani et al., 2005; Imitola et al., 2004; Klein et al., 2001; Robin et al., 2006) siendo este efecto dependiente de la interacción CXCL12-CXCR4 ya que es bloqueable por el tratamiento con Ab anti-CXCR4 (Imitola et al., 2004; Robin et al., 2006). Recientemente, se ha descrito que CXCR7, otro receptor que une CXCL12, se expresa durante el desarrollo embrionario del SNC y desempeña también un papel importante en la migración de NPC (Sanchez-Alcaniz et al., 2011; Wang et al., 2011). Aunque está por definir la expresión de CXCR7 en NPC en nuestras condiciones de cultivo, nosotros observamos que la migración de NPC es totalmente bloqueable por AMD3100 (inhibidor específico de CXCR4) (Fig. 23B), lo que sugiere una importante participación de CXCR4 en la migración de NPC en respuesta a CXCL12. Además, observamos que el tratamiento con Ptx también bloquea la migración de NPC (Fig. 23C). Ptx bloquea la señalización vía proteína G_i, lo que implicaría a CXCR4 en migración, ya que

CXCR7 no interacciona con proteínas G heterotráméricas tras la unión del ligando (Levoye et al., 2009; Sierro et al., 2007). Aún así, nuestros resultados no descartan la participación de CXCR7 como modulador de CXCR4, tal y como se ha descrito recientemente (Sanchez-Alcaniz et al., 2011; Wang et al., 2011). Ratones deficientes en CXCR4 o CXCR7 presentan el mismo defecto en la distribución de interneuronas en la corteza como consecuencia de una migración defectuosa (Sanchez-Alcaniz et al., 2011; Wang et al., 2011). Las interneuronas que se originan en la EGM expresan ambos receptores y en ensayos de quimiotaxis se observa un bloqueo total de la capacidad migratoria cuando estas NPC son tratadas con AMD3100, CCX771 (inhibidor de CXCR7) o una mezcla de ambos (Wang et al., 2011). El mecanismo propuesto es que CXCR7 no promueve migración directamente, sino que, mediante su función como **receptor “scavenger”** de CXCL12 (Boldajipour et al., 2008) regula los niveles de CXCR4 en la superficie celular (Sanchez-Alcaniz et al., 2011). La delección de la actividad de CXCR7, ya sea vía química o genética, hace que la alta concentración de CXCL12 con la que se encuentra la célula, desensibilice CXCR4 rápidamente, internalizándose éste último, lo que bloquea la migración inducida por la quimioquina (Sanchez-Alcaniz et al., 2011). En cualquier caso, CXCR4 parece ser imprescindible para iniciar las cascadas de señalización que conducen a la migración celular en respuesta a un gradiente de CXCL12.

La señalización iniciada por quimioquinas ha sido muy estudiada en células del sistema inmunológico. Los receptores de quimioquinas señalizan vía proteína G_i , que promueve la activación de una serie de cascadas intracelulares incluyendo la PI3K, Erk-1/2, PLC β y PKC, que culminan con la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares y la reorganización del citoesqueleto celular necesaria para la migración.

5.3.2.- Papel de la Ruta Jak/Stat en la Migración de NPC en Respuesta a CXCL12.

Además de estas rutas de señalización clásicas de los GPCR, varios trabajos demuestran que las quimioquinas también activan la ruta de señalización Jak-Stat, típica de señalización de citoquinas de tipo I y II. La implicación de la ruta Jak-Stat en la señalización de quimioquinas se ha demostrado utilizando inhibidores químicos y mediante modificaciones genéticas tanto en líneas celulares como en células primarias en el caso de CCR2 (Mellado et al., 1998), CXCR4 (Soriano et al., 2003; Vila-Coro et al., 1999), CCR7 (Stein et al., 2003) y CCR5 (Wong and Fish, 1998; Wong et al., 2001). Estudios mediante el uso de inhibidores químicos muestran que las Jak tienen un papel importante en las funciones de las quimioquinas y su activación es necesaria en los primeros eventos tras la unión quimioquina-receptor. En este trabajo demostramos por primera vez que la estimulación con CXCL12 de NPC promueven la activación temprana y transitoria de Jak2 (Fig. 28B). Además, y asociado a ello, se produce la fosforilación de Stat5b y su translocación al núcleo (Fig 28C y Fig 29B).

En experimentos realizados con una línea de fibrosarcoma humano que no expresa Jak2 y otra que expresa un mutante sin actividad enzimática (Watling et al., 1993) se observa que la asociación de Jak2 a CXCR4, se produce a tiempos cortos tras la estimulación con CXCL12, y es independiente de su actividad tirosina quinasa (Soriano et al., 2003). Sin embargo, la asociación de la proteína G_i a CXCR4 sólo tiene lugar en aquellas células que expresan Jak2

Wt, lo que indica que la activación de Jak2 debe ocurrir antes de la activación de la proteína G_i y, por tanto, del resto de cascadas activadas por esta última (Soriano et al., 2003). Además, al igual que en el caso de las citoquinas, las Jak fosforilan al receptor de quimioquinas en tirosinas generando sitios de anclaje para los factores de transcripción Stat. Así, los Stat son fosforilados en tirosinas por los Jak, promoviendo su traslocación al núcleo donde regulan la expresión génica.

A diferencia de lo que ocurre en citoquinas, donde las Jak interaccionan con el receptor de citoquinas por el dominio FERM, en el caso de quimioquinas los dominios de interacción no están completamente definidos (Moriguchi et al., 2005). En el caso de CXCR4 se ha identificado que el tercer bucle intracelular como un posible sitio de unión de Jak2 y de los Stat. Por otro lado, la fosforilación en la tirosina 157 del segundo bucle intracelular de CXCR4, es necesaria para la interacción de los Stat mediante sus dominios SH2 (Ahr et al., 2005). Sin embargo, la implicación de la ruta Jak-Stat en la señalización por quimioquinas sigue siendo controvertida, ya que un estudio realizado utilizando linfocitos humanos y de ratón muestra que la deficiencia en Jak2 o Jak3 no afecta a las funciones de CXCL12 (Moriguchi et al., 2005).

Cuando analizamos la capacidad de respuesta de NPC a CXCL12 en ensayos funcionales como los ensayos de quimiotaxis, obtenemos resultados contradictorios. El tratamiento de NPC con un inhibidor específico de Jak2 (Jak2 Inhibitor II) muestra un fuerte bloqueo en ensayos de quimiotaxis mediados por CXCL12 (Fig. 25A). Estos resultados coinciden con lo observado en la migración de células del sistema inmunológico donde el tratamiento con otro inhibidor de Jak2, AG490, también bloquea la quimiotaxis a CXCL12 (Soriano et al., 2003). Sin embargo, experimentos de quimiotaxis con NPC deficientes en Jak2 no muestran defectos apreciables y de hecho migran igual que las células control (Fig. 31A). Algo similar ocurre en los experimentos de (Moriguchi et al., 2005) y colaboradores con la interferencia de la expresión de Jak2 con RNAi específico en células del sistema inmunológico. Descartamos también la hipótesis de redundancia entre miembros de la familia Jak en la señalización por quimioquinas, ya que el silenciamiento de la expresión de Jak1 en NPC Jak2-KO tampoco mostró alteraciones en la respuesta a CXCL12 en ensayos de quimiotaxis (Fig. 32C). De esta manera, concluimos que la ruta Jak-Stat se activa en NPC tras la estimulación con CXCL12, pero que debe regular otro tipo de funciones diferentes a migración. En esta línea, la ruta Jak-Stat está asociada a diferenciación glial de NPC en respuesta a citoquinas de la familia de IL-6 (Barnabe-Heider et al., 2005; Miller and Gauthier, 2007). Es posible que la señalización por quimioquinas actúe de forma sinérgica con otros factores regulando la diferenciación de NPC. Durante el desarrollo, en un gradiente CXCL12 podría mediar la migración de NPC y, una finalizada su migración, podría ocurrir que la quimioquina participe junto con otros factores en la regulación de la diferenciación de NPC, campo aún poco explorado.

Los efectos observados al utilizar inhibidores de Jak2 deben atribuirse, por lo tanto, a una acción inespecífica sobre otras tirosina quinasas. La secuencia del centro activo para enzimas de una familia normalmente se encuentra muy conservada, lo que hace difícil el diseño de inhibidores específicos sin efectos colaterales (Vadas et al., 2011). En concreto muchas de las enzimas que regulan la formación de adhesiones celulares y reorganización del citoesqueleto

son enzimas con actividad tirosina quinasa como FAK (Yuan et al., 2012; Zhao and Guan, 2011), Src (Goel et al., 2012), Lyn (Wheeler et al., 2012) y Syk (Park and Cox, 2011; Wang et al., 2012). La inhibición de estas enzimas de forma inespecífica podría alterar seriamente a la capacidad migratoria de NPC.

5.3.3.- Papel de PI3K en la Migración de NPC en Respuesta a CXCL12.

Para que una célula muestre un movimiento productivo en una dirección determinada, debe adquirir asimetría en la distribución de los componentes intracelulares. Esta asimetría se consigue por la polarización de la actividad de PI3K en el frente de avance donde, mediante la síntesis de PIP_3 , se van a reclutar proteínas reguladoras de la actividad de GTPasas. Una de las funciones de las GTPasas monoméricas es la de regular la reorganización del citoesqueleto promoviendo la polarización celular y la polimerización de actina en el frente de avance necesaria para que la célula se mueva. El papel de PI3K en migración ha sido muy estudiado y está muy conservado a lo largo de la evolución. En mamíferos, todas las isoformas de PI3K de clase I están implicadas en migración, aunque existe cierta especificidad en función del tipo celular, del ligando implicado e incluso del contexto. Por ejemplo, neutrófilos deficientes en p110 γ presentan motilidad dependiendo del substrato sobre el que migren (Ferguson et al., 2007). Algo similar ocurre en células T, donde la deficiencia en p110 γ afecta a la polarización y migración en función de los quimioatrayentes utilizados (Martin et al., 2008). p110 δ además de en el sistema inmunológico, se expresa en neuronas sensoriales durante el desarrollo. Su actividad se encuentra localizada en el cono de crecimiento de los axones, dirigiendo el crecimiento axónico en respuesta a quimioatrayentes y quimiorepelentes (Eickholt et al., 2007). Las células endoteliales utilizan p110 α o p110 β para iniciar los mecanismos implicados en migración en función del estímulo utilizado (Graupera et al., 2008).

La activación de PI3K en NPC, incluso mediada por CXCL12, ha estado siempre relacionada con proliferación y supervivencia ya que CXCL12 también está relacionado con estas funciones (Gong et al., 2006; Peng et al., 2004; Wu et al., 2009). Además de su función en la supervivencia, nuestros resultados, y en concordancia con otros estudios, muestran que PI3K tiene un papel imprescindible en la migración de NPC promovida por CXCL12 (Li et al., 2010), EGF (Zhang et al., 2011), FGF (Glaser et al., 2007), BDNF (Glaser et al., 2007; Zhang et al., 2011), Nrg1 (Gambarotta et al., 2004), IGF-1 (Hurtado-Chong et al., 2009) e incluso migración promovida por campos eléctricos (Meng et al., 2011). De todos modos, estos estudios se han realizado *in vitro*, con inhibidores genéricos de la familia de PI3K, por lo que no se tiene todavía información que determine que isoforma o isoformas de PI3K están implicadas. El conocimiento del papel de estas isoformas en migración sería de gran ayuda para conocer en qué pasos de la cascada de señalización participan y, de ese modo, saber si los defectos en migración asociados a algunas patologías podrían deberse a alteraciones en la actividad de estas isoformas.

Las NPC, al igual que la mayoría de los tipos celulares, expresan de forma mayoritaria las isoformas constitutivas p110 α y p110 β (Fig. 33). En experimentos de quimiotaxis utilizando inhibidores isoforma-específicos en condiciones que no afectan a la viabilidad celular, hemos

observado que es p110 β la isoforma implicada (Fig. 35A). En concordancia con nuestros datos, estudios recientes sugieren que la activación de p110 β ocurre vía activación de GPCR (Guillermet-Guibert et al., 2008) y que en células endoteliales p110 β promueve migración en respuesta a CXCL12 (Graupera et al., 2008). En estos trabajos también se establece que p110 α se activa sólo vía tirosina quinasas y que existe una dependencia absoluta de una u otra isoforma en la fosforilación de Akt dependiendo de la naturaleza del tipo de receptor al que se une el ligando ensayado (Guillermet-Guibert et al., 2008). Sin embargo, en nuestro modelo, el tratamiento de NPC con PIK-75 o TGX-221, a las mismas concentraciones que las empleadas en los ensayos de migración, bloquea la fosforilación de Akt y Erk-1/2, tanto si el estímulo es EGF como si es CXCL12. Esto sugiere que, aunque p110 β esté implicada directamente en la migración en respuesta a CXCL12, p110 α también es activada por CXCL12. En el interior celular, las proteínas señalizadoras van regulando la función de otras proteínas a modo de abanico, diversificándose la vía inicial y pudiendo afectar en último término a rutas de señalización que clásicamente no han sido asociadas a la señalización típica del estímulo inicial. En esta línea, varios estudios muestran la activación de p110 α mediada por GPCR. Por ejemplo, la fosforilación en tirosinas del GPCR, tras la unión de su ligando, pueden actuar como sitios de anclaje de p110 α vía los dominios SH2 de la subunidad reguladora (Bousquet et al., 2006). Por otro lado, la activación de GPCR induce la activación de tirosinas quinasas, como es el caso de la activación de proteínas de la familia de las Src quinasas (Alvarez et al., 2009; Rosano et al., 2009) o la inducción de la transfosforilación del receptor de EGF (Shah et al., 2006), cuya actividad es imprescindible para la activación clásica de p110 α . Además, no hay que olvidar que, tanto los GPCR como los receptores con actividad tirosina quinasa pueden activar a Ras (Buday and Downward, 2008; Rubio et al., 2003) y por tanto, al menos en teoría, a cualquier isoforma de PI3K de clase I.

Puesto que la actividad enzimática de p110 α está más relacionada con la regulación del metabolismo celular y la proliferación (Foukas et al., 2006), la activación de p110 α por CXCL12 encajaría muy bien con el efecto proliferativo de esta quimioquina sobre NPC (Gong et al., 2006; Peng et al., 2004; Wu et al., 2009). Nosotros vemos que la inhibición de p110 α y la de p110 β bloquea la fosforilación de Erk-1/2. Varios artículos muestran que la actividad de PI3K puede ser necesaria para la completa actividad de Erk-1/2 de manera sinérgica o adicional a la cascada clásica de activación de MAPK (Bondeva et al., 1998; Lopez-Illasaca et al., 1997). Viendo que la inhibición de p110 α o de p110 β reduce la fosforilación de Akt, es posible que ambas isoformas actúen de manera sinérgica en respuesta a CXCL12 para promover la proliferación celular, mientras que con la única participación de p110 β sea posible la migración.

Confirmando los resultados obtenidos con los inhibidores, la interferencia de la expresión de p110 β en NPC produjo un fuerte bloqueo de la migración en respuesta a CXCL12 (Fig. 36B). En estos experimentos se silenció específicamente la expresión de p110 β , sin afectar a la de p110 α , descartando cualquier efecto inespecífico que los inhibidores puedan producir. Un problema de esta técnica es que el ARN utilizado para silenciar la expresión de p110 β se encuentra codificado en un plásmido. La electroporación de NPC con plásmido reduce muchísimo la viabilidad celular, si se compara con la electroporación de ARNi en

el caso del silenciamiento de los Jak, incluso en NPC electroporadas con plásmido control. Este problema, que no tiene efecto en los ensayos *in vitro*, sí complicó la realización de los experimentos *in vivo* donde el número de células es un factor muy limitante. Otro problema que surge de los experimentos de interferencia es que, a diferencia de los experimentos con el inhibidor, estamos eliminando no sólo la actividad enzimática, sino la proteína completa. Estudios recientes demuestran que p110 β , además de su función en la síntesis de PIP₃, tiene un importante papel como proteína adaptadora, que es fundamental para la supervivencia y proliferación celular (Ciraolo et al., 2008; Guillermet-Guibert et al., 2008; Jia et al., 2008). Actualmente existen ratones transgénicos que expresan las isoformas de p110 α (Foukas 2006 nature) y de p110 β (Ciraolo et al., 2008; Guillermet-Guibert et al., 2008) catalíticamente inactivas. Ambos ratones presentan desarrollo embrionario normal hasta estadios apropiados para el aislamiento de NPC. Su utilización en los experimentos *in vivo* resultará crítica y, de hecho, estamos gestionando la obtención de dichas cepas.

5.4.- Papel de PI3K en la migración de interneuronas durante corticogénesis.

Una vez demostrado el papel de la subunidad catalítica p110 β en la migración de NPC decidimos analizar su participación en un contexto más fisiológico. Para ello, realizamos ensayos de migración en cultivos organotípicos de precursores de la EGM (Fig. 50). Ha sido descrito que el principal factor quimioatrayente que guía la migración de NPC desde el **subpalio** hasta el **palio** es Nrg1 (Flames et al., 2004). Sin embargo, la deficiencia de Nrg1 no produce un bloqueo total de la llegada de interneuronas a la corteza, lo que induce a pensar que otros factores quimioatrayentes, como CXCL12, puedan actuar sinérgicamente con Nrg1. El receptor de Nrg1, ErbB4, es un receptor con actividad tirosina quinasa y por tanto, según los datos recientes en la bibliografía, susceptible de que su señalización sea vía p110 α . El fuerte bloqueo observado en la migración desde el subpalio al palio en las secciones tratadas con TGX-221 (Fig. 51A, D) sugieren la implicación específica de p110 β en la migración tangencial de NPC y, por lo tanto, de GPCR en el proceso. Así proponemos que CXCL12 tendría una doble función, la primera, ya descrita, mantener a las interneuronas migrando por la ZSV y la ZM una vez llegan a la corteza evitando la invasión temprana de la PC (Fig. 3); y la segunda, actuando como quimioatrayente en el subpalio en colaboración con otros factores.

Una de las razones por las que se había excluido a CXCL12 de esta función, era que la expresión de CXCL12 a nivel de ARNm en el cerebro en desarrollo se da en el borde palio-subpalio y no parece que se exprese en la ruta de migración que muestran las interneuronas a través del subpalio. Además, experimentos en cultivos organotípicos muestran que la eliminación de la corteza cerebral a nivel de la frontera palio-subpalio no interrumpe la migración tangencial (Marin et al., 2003; Martini et al., 2009). Sin embargo, el estudio de la expresión de CXCL12 en cerebro se ha hecho por hibridación *in-situ*, dada la falta de anticuerpos que permitan la detección de CXCL12 en secciones histológicas, con lo que no se puede descartar la presencia de un gradiente de concentración de quimioquina secretada al medio extracelular. Múltiples evidencias indican que las quimioquinas son retenidas por los glicosaminoglicanos de la matriz extracelular, originando un gradiente de concentración. La existencia de este gradiente desde la zona dorsal (mayor concentración) hasta la ventral (menor

concentración) es posible, incluso en los experimentos en los que la corteza cerebral ha sido eliminada mecánicamente.

Otra prueba de que CXCL12 no es importante para la migración subpalio-palio es que, en el ratón deficiente en CXCL12 no muestra defecto en el número de células que llegan a la corteza, sólo un defecto en el posicionamiento de éstas (Stumm et al., 2003). Sin embargo, el estudio de la migración de estas células a distintos estadios embrionarios en ratones deficientes en los receptores de CXCL12, muestran un retraso en la llegada de las células a la corteza a tiempos tempranos (Wang et al., 2011), aunque este retraso es inapreciable en estadios más avanzados. La quimioquina CXCL12 presenta un potente papel como quimioatrayente de NPC *in vitro* e *in vivo*. Tanto su expresión ectópica como el posicionamiento de bolitas tapizadas con CXCL12 sobre cultivos organotípicos hace que las interneuronas abandonen su ruta estereotípica para dirigirse hacia la fuente de quimioquina (Li et al., 2008; Wang et al., 2011). Por estas razones, y por nuestros datos, no se puede descartar que CXCL12 también actúe como quimioatrayente a través del subpalio.

Otra explicación al fuerte bloqueo en migración observado por el tratamiento de TGX-221 en cultivos organotípicos podría ser que, la alta dosis empleada de inhibidor podría estar afectando también a p110 α , impidiendo la migración promovida por Nrg1, incluso es posible que este factor también active p110 β . Estudios *in vitro*, a nivel bioquímico y ensayos de trans migración con NPC, son necesarios para evaluar estas posibilidades y así determinar si la participación de p110 β en migración de NPC es independientemente del estímulo empleado, o si al igual que ocurre en otros sistemas celulares, la participación de una isoforma u otra de PI3K en la regulación de la migración es estímulo dependiente. Cultivos organotípicos de secciones de cerebro Wt en los que se transplantaran NPC de la EGM de los ratones transgénicos para las p110 inactivas, terminarían por aclarar los mecanismos que regulan la migración de NPC en respuesta a diferentes estímulos.

5.5.- Estudio de la Motilidad de NPC en un Modelo de Isquemia Cerebral por Fototrombosis.

Además de estudiar la migración de NPC en un modelo de desarrollo embrionario, decidimos estudiar también la migración de NPC, en ratón adulto, inducida en respuesta a un daño cerebral. Se sabe que, tras un infarto cerebral, los factores secretados como consecuencia de la respuesta inflamatoria iniciada actúan como quimioatrayentes de NPC (Arvidsson et al., 2002; Imitola et al., 2004; Robin et al., 2006; Thored et al., 2006). Aunque en humanos existen varias causas que provocan infarto cerebral, siempre hay una serie de características comunes. Los modelos animales de infarto cerebral se diseñaron para generar infartos reproducibles con un mínimo de manipulación quirúrgica. En nuestro estudio hemos utilizado modelo de infarto cerebral focal por fototrombosis (Lee et al., 2007; Schroeter et al., 2002). Con este modelo hemos obtenido lesiones reproducibles en la corteza motora y sensorial (Paxinos, 2001). Además, en las lesiones generadas se observan ciertas características que se dan tras una isquemia cerebral, como la aparición de edema y muerte celular en la zona de la lesión. El estudio histológico mostró, que tras la isquemia, se activan los astrocitos produciendo astrogliosis, con

la consecuente formación de la cicatriz glial rodeando la lesión. De esta manera observamos que las isquemias inducidas por la fotoactivación del rosa bengala no sólo reproducían las características descritas inicialmente en este modelo (Lee et al., 2007; Schroeter et al., 2002), sino muchas características del infarto cerebral (Carmichael, 2005). El modelo más utilizado para estudiar el infarto cerebral es el de la oclusión intrarterial de la arteria cerebral media (MCAO). Sin embargo, el área afectada en este modelo es muy grande, el volumen infartado en el hemisferio ipsilateral es muy variable, produciendo una alta mortalidad, mientras la mayoría de los infartos en humanos son de pequeño tamaño y son producidos por una situación embólica. De esta forma, el modelo de fototrombosis presenta ciertas ventajas sobre el modelo de MCAO, ya que las lesiones se generan por la formación de trombos y son de menor tamaño, lo que se asemeja más a lo que ocurre en humanos. Como ventajas adicionales, en el modelo por fototrombosis la cirugía es más sencilla y el tamaño de la lesión es muy reproducible comparando con el modelo de MCAO.

El potencial de las células madre para diferenciarse a otros tipos celulares ha generado gran expectación como herramienta terapéutica en multitud de enfermedades donde se ha producido pérdida celular. El uso de la terapia celular está siendo muy estudiado en el caso del infarto cerebral. El trasplante de células madre por distintas vías (intravenosa, intraventricular e intraparenquimal), en roedores que han sufrido MCAO, muestra la localización preferente de las células transplantadas en el área periinfartada, mostrando menor volumen infartado y mayor recuperación funcional (Bacigaluppi et al., 2008; Bliss et al., 2007). Esto se debe a la secreción de factores quimioatrayentes que median la migración de las células madre hacia la lesión. Numerosos estudios demuestran que CXCL12 juega un papel importante en la localización de NPC y HPC en el área periinfartada (Imitola et al., 2004; Robin et al., 2006; Shyu et al., 2008; Thored et al., 2006). Por esta razón utilizamos el modelo de isquemia cerebral como modelo de migración *in vivo* de NPC en respuesta a CXCL12.

Además, en concordancia con lo publicado en el modelo de MCAO, encontramos un aumento de los niveles de expresión de CXCL12 en el hemisferio ipsilateral (Bacigaluppi et al., 2009; Imitola et al., 2004; Schonemeier et al., 2008b; Stumm et al., 2002; Thored et al., 2006). Así, podemos concluir que, el modelo de isquemia cerebral por fototrombosis es un modelo que cumple con las características necesarias para promover la migración de NPC. Por otro lado, el aumento de CXCR4 en el área infartada probablemente se deba a células del sistema inmunológico que se extravasan en la zona de la lesión. En minutos, tras la isquemia, se produce la activación del endotelio vascular que va a inducir la adhesión y extravasación de neutrófilos (Connolly et al., 1996; Garcia et al., 1994), fundamentalmente, los cuales expresan CXCR4 (Delano et al., 2011; Stumm et al., 2002). Además, los astrocitos y células de la microglía que migran también a la zona de la isquemia expresan CXCR4 (Calì and Bezzi, 2010; Lu et al., 2009; Stumm et al., 2002).

En primer lugar, decidimos utilizar la administración intravenosa de las NPC por no requerir cirugía y por permitirnos inyectar mayores volúmenes y, por tanto, mayor número de células. Realizamos el trasplante a los tres días post-inducción y evaluamos la localización de las NPC en la zona dañada a distintos tiempos por microscopía confocal y por citometría de

flujo. No se encontraron células en ninguno de los tiempos analizados en el parénquima cerebral (Fig. 44). Lo que es explicable por la ausencia de NPC en sangre en los ratones transplantados a las 24 hpt (Fig. 45).

Tras un daño cerebral se produce la activación del endotelio cerebral, en las regiones cercanas a la lesión, que se asocia a un aumento de la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas, que van a mediar el reclutamiento de células inmunológicas circulantes (Frijns and Kappelle, 2002; Pinsky et al., 1996). Además de leucocitos, varios estudios demuestran la extravasación e integración en el parénquima cerebral de NPC tras una lesión, en el caso de modelo de encefalitis alérgica experimental (Pluchino et al., 2003; Pluchino et al., 2005) y en modelos de ischemia cerebral (Bacigaluppi et al., 2009; Chu et al., 2004; Jin et al., 2005; Lee et al., 2008). En nuestras condiciones de cultivo, NPC derivadas de neuroesferas expresan bajos niveles de VLA-4 (Fig. 41 A), el receptor de VCAM-1, al igual que ocurre en NPC de ratón adulto (Pluchino et al., 2005) y en NPC humanas (Chu et al., 2004), lo que justifica la interacción de NPC con el endotelio vascular y su extravasación en la zona dañada. Además, por microscopía intravital en ratones con encefalitis alérgica experimental, el tratamiento con un mAb anti-VCAM-1 bloquea la interacción de NPC con el endotelio y la entrada en el parénquima cerebral (Pluchino et al., 2005). Algunos trabajos muestran que las NPC expresan además otros tipos de moléculas de adhesión que podrían mediar la extravasación como CD44 (Chu et al., 2004).

Todos los estudios enfocados en la detección de NPC tras el trasplante intravenoso, se han realizado empleando técnicas de microscopía. Debido a que el número de células que se integran en el parénquima es muy bajo (0,09 %) (Bacigaluppi et al., 2009), el análisis microscópico requiere de la adquisición de muchas imágenes para tener una cuantificación fiable. Por ello, decidimos poner a punto la detección de NPC por citometría de flujo, ya que esta técnica ha demostrado ser una herramienta potente para cuantificaciones de poblaciones pequeñas en células del sistema inmunológico. A pesar de ello, su utilización en tejido nervioso ha sido muy limitada (Campanella et al., 2002), dado que requiere la obtención de una suspensión celular para analizar por citometría de flujo. Nosotros utilizamos el medio de digestión descrito en un protocolo de purificación de NPC de cerebro de ratón adulto de la ZSV (Rietze and Reynolds, 2006). Aunque se trata de una digestión enzimática, el tratamiento de NPC-GFP con dicho medio no afectó ni a la viabilidad celular ni a su detección, ya que la expresión de la GFP es intracelular y, por tanto, inaccesible para el medio de digestión (Fig. 43). La citometría de flujo demostró tener una gran sensibilidad y, por tanto, un gran potencial para la detección de NPC en tejido nervioso en la puesta a punto. Sin embargo, ni el análisis por citometría (Fig. 44) ni por microscopía consiguieron demostrar la extravasación de NPC transplantadas vía intravenosa en un modelo de isquemia focal por fototrombosis. El análisis de muestras de sangre de ratones transplantados, demostró la ausencia de células a las 24 h post-trasplante, por lo que es muy posible que la causa radique en la rápida eliminación de las NPC del torrente sanguíneo. Varios estudios muestran que las NPC se retienen en varios tejidos como hígado, riñón, bazo y pulmón tras la inyección intravenosa (Bacigaluppi et al., 2009; Borlongan et al., 2004; Pluchino et al., 2005). Pudiendo ser ésta una de las causas de la rápida desaparición de NPC del torrente sanguíneo, aunque tampoco podemos descartar una

viabilidad reducida de NPC en la sangre.

Quizá una de las razones de la discordancia entre nuestros resultados y lo encontrado en la bibliografía puedan explicarse por el modelo utilizado. La baja circulación colateral y la falta de **reperfusión** que se da en el modelo isquemia focal por fototrombosis (Carmichael, 2005) puede que dificulte la extravasación de NPC en las cercanías de la lesión a diferencia de lo que ocurre en el modelo de infarto por MCAO. Otra posibilidad es que, en el modelo de MCAO, las lesiones son de mayor tamaño, produciéndose mayor muerte celular, lo que podría llevar a una respuesta inflamatoria más aguda, necesaria para que células como las NPC, cuya función no es recircular por el torrente sanguíneo, se activen y puedan extravasarse en respuesta a los estímulos quimioatrayentes, de manera eficiente, en las cercanías del área dañada.

Dada la imposibilidad de encontrar células por esta vía de administración, decidimos utilizar la vía intraparenquimal para evaluar la migración de NPC hacia la lesión. Estudios comparativos de las distintas vías de administración muestran que, aunque todos los métodos resultan en la localización de las células transplantadas en el área periinfartada, se encuentran mayor número de células cuando el trasplante es intraparenquimal, seguido de trasplante intraventricular y, en último último lugar, el trasplante intravenoso (Jin et al., 2005).

Utilizamos, primero, la administración intraparenquimal en el hemisferio contralateral, ya que la posterior localización de las NPC en el hemisferio ipsilateral, sería prueba irrefutable de su migración en respuesta al daño. Transplantamos NPC-GFP⁺ en ratones tres días post-inducción de la isquemia y analizamos su localización respecto al sitio del trasplante a distintos tiempos (Fig. 46). En ninguno de los tiempos examinados observamos la localización de NPC en el hemisferio ipsilateral. La distribución de las células a ambos lados del sitio del trasplante era similar, incluso a tiempos largos, con lo que las células no migraban hacia el hemisferio ipsilateral. Estos resultados están en contra de lo publicado por otros grupos donde observan una localización de las células en el área periinfartada cuando realizan trasplante contralateral (Erdo et al., 2003; Hoehn et al., 2002; Imitola et al., 2004; Kim et al., 2004; Modo et al., 2002a; Modo et al., 2002b; Veizovic et al., 2001). Además, en el trabajo de Imitola y colaboradores demuestran que las NPC transplantadas en el hemisferio contralateral, migran por el cuerpo cayoso para localizarse en el área periinfartada en un proceso dependiente de CXCL12 (Imitola et al., 2004). Pensamos que la causa de esta discordancia puede deberse a la localización del trasplante dentro del hemisferio contralateral. De hecho, en nuestros resultados observamos que en el grupo de ratones de tres días post-trasplante existe un mayor número de células en el lado proximal a la lesión, recorriendo distancias más largas que las que se encuentran desplazándose en sentido contrario a la lesión. Aunque el trasplante se realiza con un **equipo estereotáxico**, que permite la deposición de las células en el parénquima de manera bastante precisa, no hay que olvidar que el establecimiento de las coordenadas espaciales lleva asociado un error experimental (precisión del equipo $\pm 500 \mu\text{m}$). En concreto, en este grupo de ratones (tres días post-trasplante) el sitio de trasplante se encontraba muy cerca de la línea media, es decir, más próximo a la lesión (Fig. 47). Además, estas células muestran fenotipo migratorio con las proyecciones de membrana dirigidas en la dirección de la lesión. Con lo que es posible que una mayor cercanía del sitio del trasplante en el modelos de fototrombosis sea necesaria para que las células puedan responder al gradiente

quimioatrayente de los factores que son secretados en el área dañada.

Debido a nuestras observaciones, y a que estudios comparativos muestran una mayor localización de células en los alrededores de la lesión cuando el trasplante es ipsilateral, que cuando es contralateral (Modo et al., 2002b), decidimos probar esta vía de administración para evaluar la migración de NPC. Para ello, transplantamos NPC-RFP⁺ en el hemisferio ipsilateral, a una distancia de unos 500 μ m de la lesión para que nos permitiera evaluar el desplazamiento desde el sitio del trasplante, tal y como realizaron Delaloy y colaboradores (Delaloy et al., 2010). Esto lo conseguimos desplazando la posición de la lesión, ya que como hemos comentado anteriormente, el modelo de fototrombosis permite modificar la posición de la lesión modificando las coordenadas estereotáxicas (Fig. 48A). Debido a la cercanía a la lesión evaluamos la localización de las NPC sólo a tres días post-trasplante. De esta manera, encontramos que todas las células mostraban morfología de neuronas migratorias y se encontraban dirigidas hacia la lesión (Fig. 48B, C). Con lo que concluimos que el modelo de infarto cerebral focal por fototrombosis es un buen modelo para evaluar la capacidad migratoria de NPC transplantadas intraparenquimalmente al igual se había demostrado en el modelo por infarto cerebral por MCAO.

Como han mostrado nuestros datos, el movimiento de NPC en respuesta a CXCL12 es mediado por la actividad de la subunidad catalítica p110 β de PI3K, además, varios estudios demuestran que la migración de NPC hacia el área periinfartada es mediada por CXCL12. Debido a estas razones, decidimos utilizar este modelo de migración para testar el papel de p110 β en la capacidad migratoria de NPC. Para ello se electroporaron NPC Wt con una mezcla de shRNA p110 β y pEGFP.N1 (5:1). Como control, NPC-RFP⁺ se electroporaron con shRNA control. Se mezclaron las células shRNAcontrol y las shRNAp110 β de forma que hubiese el mismo número de células RFP⁺ que GFP⁺. La mezcla se transplantó en ratones con infarto (tres días post-inducción) y se analizó la localización de las células tres días post-trasplante. Al igual que en el experimento anterior, las células tenían fenotipo migratorio y estaban dirigidas hacia la lesión. Sin embargo, en contra de lo esperado, no observamos diferencia en la capacidad migratoria de las células shRNAp110 β y las shRNAcontrol. Esto podría deberse a varias posibilidades, por ejemplo, a la eficiencia del silenciamiento, al modelo *in vivo* empleado, etc. En el primer caso, los experimentos de interferencia no siempre son eficientes. En algunos experimentos encontramos situaciones en los que la eficiencia de la nucleofección era aceptable (cuantificado por fluorescencia de GFP) mientras que no se observaba silenciamiento de la expresión de p110 β por Q-PCR. En el caso de los experimentos de quimiotaxis esto fue controlado en todo momento para asociar los defectos en migración a la deficiencia en p110 β . En los experimentos *in vivo*, el control es más difícil, siempre realizamos el trasplante en un grupo de ratones grande para obtener resultados fiables y minimizar la variabilidad. Ello llevó a tener que usar un gran número de células por lo que no siempre pudimos realizar los controles de expresión de p110 β . En cuanto a la segunda posibilidad, podría ocurrir que el silenciamiento de p110 β sea eficiente, pero que las células respondan a otros estímulos migratorios independientes de p110 β . Por ejemplo, se sabe que tras la isquemia, la activación de la microglía y astrocitos, además de ejercer su papel como iniciadores de la respuesta inflamatoria en el SNC, cumplen con una importante función neuroprotectora

(Hanisch and Kettenmann, 2007; Rossi et al., 2007)(Hanisch UK 2007 Nature Neurosci 10 11 1387-1393; Rossi DJ Nature Neurosci 2007 10 11 1377-1385). Esto lo consiguen secretando factores neurotróficos como BDNF, NGF, VEGF, FGF2 (Bacigaluppi et al., 2009; Belanger and Magistretti, 2009; Narantuya et al., 2010) que además de aumentar la supervivencia neuronal tras el daño, podrían actuar como **factores motogénicos** y/o quimioatrayentes de NPC (Glaser et al., 2007; Zhang et al., 2011). Los receptores de estos factores tienen actividad tirosina quinasa intrínseca, siendo posible que su acción quimiotáctica esté mediada por p110 α . Con lo que es imprescindible conocer si p110 α puede mediar la migración de NPC en respuesta a otros estímulos distintos a CXCL12. Para ello se hace imprescindible el uso de NPC derivadas de los ratones transgénicos sin actividad de p110 α o de p110 β . Además, el uso de estas células evitaría la utilización de técnicas de electroporación, con lo que el número de células dejaría de ser un problema para la realización de estos ensayos *in vivo*. Sin embargo, este aspecto no es probablemente el más implicado en nuestro caso ya que, como se ha referido anteriormente, hay varios trabajos que demuestran la participación directa de CXCL12 en la atracción de NPC al área infartada (Imitola et al., 2004; Robin et al., 2006; Thored et al., 2006).

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

- 1) Las células progenitoras/precursoras de origen embrionario se pueden mantener en cultivo por un tiempo prolongado en un estado indiferenciado, manteniendo las características de autorrenovación y multipotencia.
- 2) EGF y FGF son importantes para la supervivencia y proliferación de las NPC. Sin embargo, dosis elevadas (20 ng/mL) interfieren con el movimiento celular dirigido por CXCL12.
- 3) En experimentos *in vitro*, la interacción de CXCL12 con CXCR4 tiene un efecto motogénico y como quimioatrayente sobre precursores neurales.
- 4) El efecto quimioatrayente de CXCL12 es dependiente del componente de la matriz extracelular utilizado en los ensayos *in vitro*.
- 5) El uso de inhibidores químicos de Jak2, Erk-1/2 y PI3K bloquea el movimiento de NPC dirigido por CXCL12.
- 6) Aunque CXCL12 activa la ruta de señalización Jak/Stat, los experimentos usando precursores neuronales procedentes de ratones deficientes en Jak2 en combinación con experimentos de silenciamiento de la expresión de Jak1 en células Jak2-KO o control, demuestran que ésta ruta no está involucrada en el movimiento celular promovido por CXCL12. Los efectos observados con el inhibidor se deben probablemente a un efecto inespecífico del mismo.

- 7) La activación de la ruta de PI3K es imprescindible para que NPC migren en respuesta a un gradiente de CXCL12. Aunque CXCL12 promueve la activación de p110 α y de p110 β , nuestros resultados asignan a esta segunda isoforma el papel más importante en la migración de precursores neuronales.
- 8) El modelo de infarto cerebral focal por fototrombosis realizado en ratones, reproduce la formación del edema, la muerte celular, la astrogliosis y la formación de la cicatriz glial, como sucede en el infarto cerebral en humanos.
- 9) El modelo de infarto cerebral por fototrombosis permite estudiar la migración *in vivo* de precursores neuronales debido al incremento de la expresión de CXCL12 en el área afectada. En los resultados de estos estudios es crítico que la administración sea intraparenquimal y en las cercanías de la lesión dado que la vía intravenosa no permite la detección de precursores en el área infartada.
- 10) El modelo de migración en cultivos organotípicos reproduce la migración *in vivo* de precursores neuronales desde la eminencia ganglionar media hasta la corteza cerebral durante la corticogénesis. En ese movimiento la activación de p110 β mediada por quimioatrayentes resulta imprescindible.

BIBLIOGRAFÍA

7.- BIBLIOGRAFÍA

A

Abramov, A.Y., Scorziello, A., and Duchen, M.R. (2007). Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci* 27, 1129-1138.

Ahr, B., Denizot, M., Robert-Hebmann, V., Brelot, A., and Biard-Piechaczyk, M. (2005). Identification of the cytoplasmic domains of CXCR4 involved in Jak2 and STAT3 phosphorylation. *J Biol Chem* 280, 6692-6700.

Aimone, J.B., Deng, W., and Gage, F.H. (2011). Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron* 70, 589-596.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell* (Garland Science Taylor & Francis Group).

Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15, 6541-6551.

Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R.J., Reese, C.B., and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B \pm . *Current biology : CB* 7, 261-269.

Altman, J., and Das, G.D. (1965a). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319-335.

Altman, J., and Das, G.D. (1965b). Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207, 953-956.

Alvarez, C.J., Lodeiro, M., Theodoropoulou, M., Camina, J.P., Casanueva, F.F., and Pazos, Y. (2009). Obestatin stimulates Akt signalling in gastric cancer cells through beta-arrestin-mediated epidermal growth factor receptor transactivation. *Endocr Relat Cancer* 16, 599-611.

Arai, H., and Charo, I.F. (1996). Differential regulation of G-protein-mediated signaling by chemokine receptors. *J Biol Chem* 271, 21814-21819.

Arora, T., Liu, B., He, H., Kim, J., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Modlin, R.L., and Shuai, K. (2003). PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem* 278, 21327-21330.

Arundine, M., and Tymianski, M. (2004). Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 657-668.

Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8, 963-970.

Ayala, R., Shu, T., and Tsai, L.H. (2007). Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128, 29-43.

B

Babcock, G.J., Farzan, M., and Sodroski, J. (2003). Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor. *J Biol Chem* 278, 3378-3385.

Bacigaluppi, M., Pluchino, S., Martino, G., Kilic, E., and Hermann, D.M. (2008). Neural stem/precursor cells for the treatment of ischemic stroke. *J Neurol Sci* 265, 73-77.

Bacigaluppi, M., Pluchino, S., Peruzzotti-Jametti, L., Kilic, E., Kilic, U., Salani, G., Brambilla, E., West, M.J., Comi, G., Martino, G., et al. (2009). Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. *Brain* 132, 2239-2251.

Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K.Y., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., and Bachelier, F. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280, 35760-35766.

Barnabe-Heider, F., Wasyluka, J.A., Fernandes, K.J., Porsche, C., Sendtner, M., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2005). Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1. *Neuron* 48, 253-265.

Behar, T.N., Dugich-Djordjevic, M.M., Li, Y.X., Ma, W., Somogyi, R., Wen, X., Brown, E., Scott, C., McKay, R.D., and Barker, J.L. (1997). Neurotrophins stimulate chemotaxis of embryonic cortical neurons. *Eur J Neurosci* 9, 2561-2570.

Belanger, M., and Magistretti, P.J. (2009). The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci* 11, 281-295.

Bellion, A., Baudoin, J.P., Alvarez, C., Bornens, M., and Metin, C. (2005). Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J Neurosci* 25, 5691-5699.

Belmadani, A., Tran, P.B., Ren, D., Assimacopoulos, S., Grove, E.A., and Miller, R.J. (2005). The Chemokine Stromal Cell-Derived Factor-1 Regulates the Migration of Sensory Neuron Progenitors. *The Journal of Neuroscience* 25, 3995-4003.

Bi, L., Okabe, I., Bernard, D.J., and Nussbaum, R.L. (2002). Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm Genome* 13, 169-172.

Bi, L., Okabe, I., Bernard, D.J., Wynshaw-Boris, A., and Nussbaum, R.L. (1999). Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 274, 10963-10968.

Bielle, F., Griveau, A., Narboux-Neme, N., Vigneau, S., Sigrist, M., Arber, S., Wassef, M., and Pierani, A. (2005). Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* 8, 1002-1012.

Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T.A. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-833.

Bliss, T., Guzman, R., Daadi, M., and Steinberg, G.K. (2007). Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 38, 817-826.

Boldajipour, B., Mahabaleshwar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q., and Raz, E. (2008). Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 132, 463-473.

Bondeva, T., Pirola, L., Bulgarelli-Leva, G., Rubio, I., Wetzker, R., and Wymann, M.P. (1998). Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* 282, 293-296.

Borlongan, C.V., Hadman, M., Sanberg, C.D., and Sanberg, P.R. (2004). Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke* 35, 2385-2389.

Borrell, V., and Marin, O. (2006). Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nat Neurosci* 9, 1284-1293.

Bousquet, C., Guillermet-Guibert, J., Saint-Laurent, N., Archer-Lahlou, E., Lopez, F., Fanjul, M., Ferrand, A., Fourmy, D., Pichereaux, C., Monsarrat, B., et al. (2006). Direct binding of p85 to sst2 somatostatin receptor reveals a novel mechanism for inhibiting PI3K pathway. *EMBO J* 25, 3943-3954.

Buday, L., and Downward, J. (2008). Many faces of Ras activation. *Biochim Biophys Acta* 1786, 178-187.

Buttini, M., Sauter, A., and Boddeke, H.W. (1994). Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 23, 126-134.

C

Cahill, M.A., Janknecht, R., and Nordheim, A. (1996). Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr Biol* 6, 16-19.

Cain, R.J., and Ridley, A.J. (2009). Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biol Cell* 101, 13-29.

Cali, C., and Bezzi, P. (2010). CXCR4-mediated glutamate exocytosis from astrocytes. *Journal of Neuroimmunology* 224, 13-21.

Campanella, M., Sciorati, C., Tarozzo, G., and Beltramo, M. (2002). Flow cytometric

analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke* 33, 586-592.

Carlen, M., Meletis, K., Goritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., Amendola, M., Barnabe-Heider, F., Yeung, M.S., Naldini, L., et al. (2009). Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci* 12, 259-267.

Carmichael, S.T. (2005). Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2, 396-409.

Caviness, V.S., Jr., and Takahashi, T. (1995). Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain Dev* 17, 159-163.

Ceradini, D.J., Kulkarni, A.R., Callaghan, M.J., Tepper, O.M., Bastidas, N., Kleinman, M.E., Capla, J.M., Galiano, R.D., Levine, J.P., and Gurtner, G.C. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10, 858-864.

Chamberlain, M.D., Chan, T., Oberg, J.C., Hawrysh, A.D., James, K.M., Saxena, A., Xiang, J., and Anderson, D.H. (2008). Disrupted RabGAP function of the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase results in cell transformation. *J Biol Chem* 283, 15861-15868.

Chang, D.I., Hosomi, N., Lucero, J., Heo, J.H., Abumiya, T., Mazar, A.P., and del Zoppo, G.J. (2003). Activation systems for latent matrix metalloproteinase-2 are upregulated immediately after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 1408-1419.

Chu, K., Kim, M., Chae, S.H., Jeong, S.W., Kang, K.S., Jung, K.H., Kim, J., Kim, Y.J., Kang, L., Kim, S.U., et al. (2004). Distribution and in situ proliferation patterns of intravenously injected immortalized human neural stem-like cells in rats with focal cerebral ischemia. *Neurosci Res* 50, 459-465.

Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-1805.

Ciraolo, E., Iezzi, M., Marone, R., Marengo, S., Curcio, C., Costa, C., Azzolino, O., Gonella, C., Rubinetto, C., Wu, H., et al. (2008). Phosphoinositide 3-kinase p110beta activity: key role in metabolism and mammary gland cancer but not development. *Sci Signal* 1, ra3.

Connolly, E.S., Jr., Winfree, C.J., Springer, T.A., Naka, Y., Liao, H., Yan, S.D., Stern, D.M., Solomon, R.A., Gutierrez-Ramos, J.C., and Pinsky, D.J. (1996). Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 97, 209-216.

Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F., and Gutkind, J.S. (1994). Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 369, 418-420.

Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F., and Godin, I. (1996). Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 86, 907-916.

D

Damaj, B.B., McColl, S.R., Mahana, W., Crouch, M.F., and Naccache, P.H. (1996). Physical association of Gi2alpha with interleukin-8 receptors. *J Biol Chem* 271, 12783-

Daniel, D., Rossel, M., Seki, T., and Konig, N. (2005). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) expression in embryonic mouse cerebral cortex starts in the intermediate zone close to the pallial-subpallial boundary and extends progressively towards the cortical hem. *Gene Expr Patterns* 5, 317-322.

David, M., Chen, H.E., Goelz, S., Larner, A.C., and Neel, B.G. (1995). Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol* 15, 7050-7058.

Dehmelt, L., and Halpain, S. (2004). Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J Neurobiol* 58, 18-33.

Del Bigio, M.R. (1995). The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia* 14, 1-13.

Delaloy, C., Liu, L., Lee, J.A., Su, H., Shen, F., Yang, G.Y., Young, W.L., Ivey, K.N., and Gao, F.B. (2010). MicroRNA-9 coordinates proliferation and migration of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Cell Stem Cell* 6, 323-335.

Delano, M.J., Kelly-Scumpia, K.M., Thayer, T.C., Winfield, R.D., Scumpia, P.O., Cuenca, A.G., Harrington, P.B., O'Malley, K.A., Warner, E., Gabrilovich, S., et al. (2011). Neutrophil Mobilization from the Bone Marrow during Polymicrobial Sepsis Is Dependent on CXCL12 Signaling. *The Journal of Immunology* 187, 911-918.

Delgado, P., Cubelos, B., Calleja, E., Martinez-Martin, N., Cipres, A., Merida, I., Bellas, C., Bustelo, X.R., and Alarcon, B. (2009). Essential function for the GTPase TC21 in homeostatic antigen receptor signaling. *Nat Immunol* 10, 880-888.

Di Cristo, G. (2007). Development of cortical GABAergic circuits and its implications for neurodevelopmental disorders. *Clin Genet* 72, 1-8.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.

Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-5061.

Duan, X., Chang, J.H., Ge, S., Faulkner, R.L., Kim, J.Y., Kitabatake, Y., Liu, X.B., Yang, C.H., Jordan, J.D., Ma, D.K., et al. (2007). Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell* 130, 1146-1158.

E

Eddleston, M., and Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54, 15-36.

Eickholt, B.J., Ahmed, A.I., Davies, M., Papakonstanti, E.A., Pearce, W., Starkey, M.L., Bilancio, A., Need, A.C., Smith, A.J., Hall, S.M., et al. (2007). Control of axonal growth and regeneration of sensory neurons by the p110delta PI 3-kinase. *PLoS One* 2, e869.

Ellis, I.R., Schor, A.M., and Schor, S.L. (2007). EGF AND TGF- α motogenic activities are mediated by the EGF receptor via distinct matrix-dependent mechanisms. *Exp Cell Res* 313, 732-741.

Erdo, F., Buhrle, C., Blunk, J., Hoehn, M., Xia, Y., Fleischmann, B., Focking, M., Kustermann, E., Kolossov, E., Hescheler, J., et al. (2003). Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 780-785.

F

Fan, G., Martinowich, K., Chin, M.H., He, F., Fouse, S.D., Hutnick, L., Hattori, D., Ge, W., Shen, Y., Wu, H., et al. (2005). DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development* 132, 3345-3356.

Farooq, A., and Zhou, M.M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* 16, 769-779.

Ferguson, G.J., Milne, L., Kulkarni, S., Sasaki, T., Walker, S., Andrews, S., Crabbe, T., Finan, P., Jones, G., Jackson, S., et al. (2007). PI(3)Kgamma has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. *Nat Cell Biol* 9, 86-91.

Flames, N., Long, J.E., Garratt, A.N., Fischer, T.M., Gassmann, M., Birchmeier, C., Lai, C., Rubenstein, J.L., and Marin, O. (2004). Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44, 251-261.

Foukas, L.C., Berenjano, I.M., Gray, A., Khwaja, A., and Vanhaesebroeck, B. (2010). Activity of any class IA PI3K isoform can sustain cell proliferation and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 11381-11386.

Foukas, L.C., Claret, M., Pearce, W., Okkenhaug, K., Meek, S., Peskett, E., Sancho, S., Smith, A.J., Withers, D.J., and Vanhaesebroeck, B. (2006). Critical role for the p110 α phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature* 441, 366-370.

Frade, J.M., Mellado, M., del Real, G., Gutierrez-Ramos, J.C., Lind, P., and Martinez, A.C. (1997). Characterization of the CCR2 chemokine receptor: functional CCR2 receptor expression in B cells. *J Immunol* 159, 5576-5584.

Frijns, C.J., and Kappelle, L.J. (2002). Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 33, 2115-2122.

Fujimoto, M., and Naka, T. (2003). Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. *Trends Immunol* 24, 659-666.

G

Gambarotta, G., Garzotto, D., Destro, E., Mautino, B., Giampietro, C., Cutrupi, S., Dati, C., Cattaneo, E., Fasolo, A., and Perroteau, I. (2004). ErbB4 expression in neural progenitor cells (ST14A) is necessary to mediate neuregulin-1 β 1-induced migration. *J Biol Chem* 279, 48808-48816.

Garcia, J.H., Liu, K.F., Yoshida, Y., Lian, J., Chen, S., and del Zoppo, G.J. (1994). Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol*

Gheusi, G., Cremer, H., McLean, H., Chazal, G., Vincent, J.D., and Lledo, P.M. (2000). Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1823-1828.

Glaser, T., Brose, C., Franceschini, I., Hamann, K., Smorodchenko, A., Zipp, F., Dubois-Dalq, M., and Brustle, O. (2007). Neural cell adhesion molecule polysialylation enhances the sensitivity of embryonic stem cell-derived neural precursors to migration guidance cues. *Stem Cells* 25, 3016-3025.

Goel, H.L., Pursell, B., Standley, C., Fogarty, K., and Mercurio, A.M. (2012). Neuropilin-2 regulates $\alpha_5\beta_1$ integrin in the formation of focal adhesions and signaling. *Journal of Cell Science* 125, 497-506.

Goldsmith, E.J., Cobb, M.H., and Chang, C.I. (2004). Structure of MAPKs. *Methods Mol Biol* 250, 127-144.

Gong, X., He, X., Qi, L., Zuo, H., and Xie, Z. (2006). Stromal cell derived factor-1 acutely promotes neural progenitor cell proliferation in vitro by a mechanism involving the ERK1/2 and PI-3K signal pathways. *Cell Biol Int* 30, 466-471.

Gourmala, N.G., Buttini, M., Limonta, S., Sauter, A., and Boddeke, H.W. (1997). Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. *J Neuroimmunol* 74, 35-44.

Gourmala, N.G., Limonta, S., Bochelen, D., Sauter, A., and Boddeke, H.W. (1999). Localization of macrophage inflammatory protein: macrophage inflammatory protein-1 expression in rat brain after peripheral administration of lipopolysaccharide and focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 88, 1255-1266.

Graupera, M., Guillermet-Guibert, J., Foukas, L.C., Phng, L.K., Cain, R.J., Salpekar, A., Pearce, W., Meek, S., Millan, J., Cutillas, P.R., et al. (2008). Angiogenesis selectively requires the p110alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature* 453, 662-666.

Guillermet-Guibert, J., Bjorklof, K., Salpekar, A., Gonella, C., Ramadani, F., Bilancio, A., Meek, S., Smith, A.J., Okkenhaug, K., and Vanhaesebroeck, B. (2008). The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8292-8297.

Gupta, S., Ramjaun, A.R., Haiko, P., Wang, Y., Warne, P.H., Nicke, B., Nye, E., Stamp, G., Alitalo, K., and Downward, J. (2007). Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell* 129, 957-968.

H

Hamann, G.F., Okada, Y., Fitridge, R., and del Zoppo, G.J. (1995). Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 26, 2120-2126.

Hanisch, U.K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10, 1387-1394.

- Hazeki, O., Okada, T., Kurosu, H., Takasuga, S., Suzuki, T., and Katada, T. (1998). Activation of PI 3-kinase by G protein betagamma subunits. *Life Sci* 62, 1555-1559.
- Heo, J.H., Han, S.W., and Lee, S.K. (2005). Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med* 39, 51-70.
- Higginbotham, H.R., and Gleeson, J.G. (2007). The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci* 30, 276-283.
- Hilton, D.J., Richardson, R.T., Alexander, W.S., Viney, E.M., Willson, T.A., Sprigg, N.S., Starr, R., Nicholson, S.E., Metcalf, D., and Nicola, N.A. (1998). Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 114-119.
- Hoehn, M., Kustermann, E., Blunk, J., Wiedermann, D., Trapp, T., Wecker, S., Focking, M., Arnold, H., Hescheler, J., Fleischmann, B.K., et al. (2002). Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16267-16272.
- Hollinger, S., and Hepler, J.R. (2002). Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 54, 527-559.
- Horvath, C.M., Wen, Z., and Darnell, J.E., Jr. (1995). A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev* 9, 984-994.
- Hu, H. (1999). Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 23, 703-711.
- Hu, H., Tomasiewicz, H., Magnuson, T., and Rutishauser, U. (1996). The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 16, 735-743.
- Huising, M.O., Stet, R.J., Kruiswijk, C.P., Savelkoul, H.F., and Lidy Verburg-van Kemenade, B.M. (2003). Molecular evolution of CXC chemokines: extant CXC chemokines originate from the CNS. *Trends Immunol* 24, 307-313.
- Hurtado-Chong, A., Yusta-Boyo, M.J., Vergano-Vera, E., Bulfone, A., de Pablo, F., and Vicario-Abejon, C. (2009). IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone. *Eur J Neurosci* 30, 742-755.
- Ihrle, R.A., and Alvarez-Buylla, A. (2011). Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron* 70, 674-686.
- Imitola, J., Raddassi, K., Park, K.I., Mueller, F.J., Nieto, M., Teng, Y.D., Frenkel, D., Li, J., Sidman, R.L., Walsh, C.A., et al. (2004). Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18117-18122.
- Jackson, S.P., Schoenwaelder, S.M., Goncalves, I., Nesbitt, W.S., Yap, C.L., Wright, C.E., Kenche, V., Anderson, K.E., Dopheide, S.M., Yuan, Y., et al. (2005). PI 3-kinase p110[beta]: a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med* 11, 507-514.

J

Jaglin, X.H., Poirier, K., Saillour, Y., Buhler, E., Tian, G., Bahi-Buisson, N., Fallet-Bianco, C., Phan-Dinh-Tuy, F., Kong, X.P., Bomont, P., et al. (2009). Mutations in the beta-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. *Nat Genet* 41, 746-752.

Janowski, M. (2009). Functional diversity of SDF-1 splicing variants. *Cell adhesion & migration* 3, 243-249.

Jia, S., Liu, Z., Zhang, S., Liu, P., Zhang, L., Lee, S.H., Zhang, J., Signoretti, S., Loda, M., Roberts, T.M., et al. (2008). Essential roles of PI(3)K-p110beta in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature* 454, 776-779.

Jiang, Q., Zhang, Z.G., Ding, G.L., Zhang, L., Ewing, J.R., Wang, L., Zhang, R., Li, L., Lu, M., Meng, H., et al. (2005). Investigation of neural progenitor cell induced angiogenesis after embolic stroke in rat using MRI. *Neuroimage* 28, 698-707.

Jin, K., Minami, M., Lan, J.Q., Mao, X.O., Batteur, S., Simon, R.P., and Greenberg, D.A. (2001). Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 4710-4715.

Jin, K., Sun, Y., Xie, L., Mao, X.O., Childs, J., Peel, A., Logvinova, A., Banwait, S., and Greenberg, D.A. (2005). Comparison of ischemia-directed migration of neural precursor cells after intrastriatal, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat. *Neurobiol Dis* 18, 366-374.

Justicia, C., Panes, J., Sole, S., Cervera, A., Deulofeu, R., Chamorro, A., and Planas, A.M. (2003). Neutrophil Infiltration Increases Matrix Metalloproteinase-9 in the Ischemic Brain after Occlusion/Reperfusion of the Middle Cerebral Artery in Rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 1430-1440.

K

Kamiya, A., Kubo, K., Tomoda, T., Takaki, M., Youn, R., Ozeki, Y., Sawamura, N., Park, U., Kudo, C., Okawa, M., et al. (2005). A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol* 7, 1167-1178.

Kamura, T., Burian, D., Yan, Q., Schmidt, S.L., Lane, W.S., Querido, E., Branton, P.E., Shilatifard, A., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2001). Muf1, a novel Elongin BC-interacting leucine-rich repeat protein that can assemble with Cul5 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 276, 29748-29753.

Kamura, T., Sato, S., Haque, D., Liu, L., Kaelin, W.G., Jr., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1998). The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev* 12, 3872-3881.

Keays, D.A., Tian, G., Poirier, K., Huang, G.J., Siebold, C., Cleak, J., Oliver, P.L., Fray, M., Harvey, R.J., Molnar, Z., et al. (2007). Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell* 128, 45-57.

Kerjan, G., and Gleeson, J.G. (2007). Genetic mechanisms underlying abnormal

neuronal migration in classical lissencephaly. *Trends Genet* 23, 623-630.

Kim, D.E., Schellingerhout, D., Ishii, K., Shah, K., and Weissleder, R. (2004). Imaging of stem cell recruitment to ischemic infarcts in a murine model. *Stroke* 35, 952-957.

Kim, J.S., Gautam, S.C., Chopp, M., Zaloga, C., Jones, M.L., Ward, P.A., and Welch, K.M. (1995). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neuroimmunol* 56, 127-134.

Klein, R.S., Rubin, J.B., Gibson, H.D., DeHaan, E.N., Alvarez-Hernandez, X., Segal, R.A., and Luster, A.D. (2001). SDF-1 alpha induces chemotaxis and enhances Sonic hedgehog-induced proliferation of cerebellar granule cells. *Development* 128, 1971-1981.

Knight, Z.A., Gonzalez, B., Feldman, M.E., Zunder, E.R., Goldenberg, D.D., Williams, O., Loewith, R., Stokoe, D., Balla, A., Toth, B., et al. (2006). A Pharmacological Map of the PI3-K Family Defines a Role for p110alpha in Insulin Signaling. *Cell* 125, 733-747.

Koch, W.J., Hawes, B.E., Allen, L.F., and Lefkowitz, R.J. (1994). Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12706-12710.

Kok, K., Nock, G.E., Verrall, E.A., Mitchell, M.P., Hommes, D.W., Peppelenbosch, M.P., and Vanhaesebroeck, B. (2009). Regulation of p110delta PI 3-kinase gene expression. *PLoS One* 4, e5145.

Kokovay, E., Goderie, S., Wang, Y., Lotz, S., Lin, G., Sun, Y., Roysam, B., Shen, Q., and Temple, S. (2010). Adult SVZ lineage cells home to and leave the vascular niche via differential responses to SDF1/CXCR4 signaling. *Cell Stem Cell* 7, 163-173.

Kondziolka, D., Steinberg, G.K., Wechsler, L., Meltzer, C.C., Elder, E., Gebel, J., Decesare, S., Jovin, T., Zafonte, R., Lebowitz, J., et al. (2005). Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J Neurosurg* 103, 38-45.

Kondziolka, D., Wechsler, L., Goldstein, S., Meltzer, C., Thulborn, K.R., Gebel, J., Jannetta, P., DeCesare, S., Elder, E.M., McGrogan, M., et al. (2000). Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 55, 565-569.

Kornblum, H.I., Hussain, R.J., Bronstein, J.M., Gall, C.M., Lee, D.C., and Seroogy, K.B. (1997). Prenatal ontogeny of the epidermal growth factor receptor and its ligand, transforming growth factor alpha, in the rat brain. *The journal of comparative neurology* 380, 243-261.

Kriegstein, A.R., and Noctor, S.C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci* 27, 392-399.

Kubo, H., Hazeki, K., Takasuga, S., and Hazeki, O. (2005). Specific role for p85/p110beta in GTP-binding-protein-mediated activation of Akt. *Biochem J* 392, 607-614.

Kurosu, H., and Katada, T. (2001). Association of phosphatidylinositol 3-kinase composed of p110beta-catalytic and p85-regulatory subunits with the small GTPase Rab5. *J Biochem* 130, 73-78.

Lee, J.K., Park, M.S., Kim, Y.S., Moon, K.S., Joo, S.P., Kim, T.S., Kim, J.H., and Kim, S.H. (2007). Photochemically induced cerebral ischemia in a mouse model. *Surg Neurol* 67, 620-625; discussion 625.

Lee, S.T., Chu, K., Jung, K.H., Kim, S.J., Kim, D.H., Kang, K.M., Hong, N.H., Kim, J.H., Ban, J.J., Park, H.K., et al. (2008). Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke. *Brain* 131, 616-629.

Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelier, F., and Lagane, B. (2009). CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* 113, 6085-6093.

Li, G., Adesnik, H., Li, J., Long, J., Nicoll, R.A., Rubenstein, J.L., and Pleasure, S.J. (2008). Regional distribution of cortical interneurons and development of inhibitory tone are regulated by Cxcl12/Cxcr4 signaling. *J Neurosci* 28, 1085-1098.

Li, S., Deng, L., Gong, L., Bian, H., Dai, Y., and Wang, Y. (2010). Upregulation of CXCR4 favoring neural-like cells migration via AKT activation. *Neurosci Res* 67, 293-299.

Lin, A.C., and Holt, C.E. (2007). Local translation and directional steering in axons. *EMBO J* 26, 3729-3736.

Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79, 1431-1568.

Liu, B., Gross, M., ten Hoeve, J., and Shuai, K. (2001). A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3203-3207.

Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D., and Shuai, K. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10626-10631.

Liu, T., Clark, R.K., McDonnell, P.C., Young, P.R., White, R.F., Barone, F.C., and Feuerstein, G.Z. (1994). Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. *Stroke* 25, 1481-1488.

Liu, T., McDonnell, P.C., Young, P.R., White, R.F., Siren, A.L., Hallenbeck, J.M., Barone, F.C., and Feuerstein, G.Z. (1993). Interleukin-1 β mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke* 24, 1746-1750; discussion 1750-1741.

Llado, J., Haenggeli, C., Maragakis, N.J., Snyder, E.Y., and Rothstein, J.D. (2004). Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci* 27, 322-331.

Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145-1148.

Lopez-Bendito, G., Sanchez-Alcaniz, J.A., Pla, R., Borrell, V., Pico, E., Valdeolmillos, M., and Marin, O. (2008). Chemokine signaling controls intracortical migration and final distribution of GABAergic interneurons. *J Neurosci* 28, 1613-1624.

Lopez-Ilasaca, M., Crespo, P., Pellici, P.G., Gutkind, J.S., and Wetzker, R. (1997).

Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 275, 394-397.

LoTurco, J.J., and Bai, J. (2006). The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends Neurosci* 29, 407-413.

Lu, D.-Y., Tang, C.-H., Yeh, W.-L., Wong, K.-L., Lin, C.-P., Chen, Y.-H., Lai, C.-H., Chen, Y.-F., Leung, Y.-M., and Fu, W.-M. (2009). SDF-1alpha up-regulates interleukin-6 through CXCR4, PI3K/Akt, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in microglia. *European Journal of Pharmacology* 613, 146-154.

Lu, M., Grove, E.A., and Miller, R.J. (2002). Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7090-7095.

Lu, Q., Sun, E.E., Klein, R.S., and Flanagan, J.G. (2001). Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell* 105, 69-79.

Lysko, D.E., Putt, M., and Golden, J.A. (2011). SDF1 regulates leading process branching and speed of migrating interneurons. *J Neurosci* 31, 1739-1745.

M

Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T., and Springer, T.A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9448-9453.

Maier, U., Babich, A., and Nurnberg, B. (1999). Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J Biol Chem* 274, 29311-29317.

Manent, J.B., Wang, Y., Chang, Y., Paramasivam, M., and LoTurco, J.J. (2009). Dcx reexpression reduces subcortical band heterotopia and seizure threshold in an animal model of neuronal migration disorder. *Nat Med* 15, 84-90.

Marin, O., Plump, A.S., Flames, N., Sanchez-Camacho, C., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L. (2003). Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* 130, 1889-1901.

Marin, O., and Rubenstein, J.L. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2, 780-790.

Marin, O., and Rubenstein, J.L.R. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annual review of neuroscience* 26, 441-483.

Marin, O., Valdeolmillos, M., and Moya, F. (2006). Neurons in motion: same principles for different shapes? *Trends Neurosci* 29, 655-661.

Marques, M., Kumar, A., Cortes, I., Gonzalez-Garcia, A., Hernandez, C., Moreno-Ortiz, M.C., and Carrera, A.C. (2008). Phosphoinositide 3-kinases p110alpha and p110beta regulate cell cycle entry, exhibiting distinct activation kinetics in G1 phase. *Mol Cell Biol* 28,

Marques, M., Kumar, A., Poveda, A.M., Zuluaga, S., Hernandez, C., Jackson, S., Pasero, P., and Carrera, A.C. (2009). Specific function of phosphoinositide 3-kinase beta in the control of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7525-7530.

Martin, A.L., Schwartz, M.D., Jameson, S.C., and Shimizu, Y. (2008). Selective regulation of CD8 effector T cell migration by the p110 gamma isoform of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 180, 2081-2088.

Martini, F.J., Valiente, M., Lopez Bendito, G., Szabo, G., Moya, F., Valdeolmillos, M., and Marin, O. (2009). Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development* 136, 41-50.

Matsumoto T, I.K., Mukaida N, Harada A, Matsumoto Y, Yamashita J, Matsushima K. (1997). Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to interleukin-8. *Lab Invest* 77, 119-125.

Matsumoto, T., Yokoi, K., Mukaida, N., Harada, A., Yamashita, J., Watanabe, Y., and Matsushima, K. (1997). Pivotal role of interleukin-8 in the acute respiratory distress syndrome and cerebral reperfusion injury. *Journal of Leukocyte Biology* 62, 581-587.

Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Aragay, A., del Real, G., Martin, A.M., Vila-Coro, A.J., Serrano, A., Mayor, F., Jr., and Martinez, A.C. (1998). The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J Immunol* 161, 805-813.

Meltzer, C.C., Kondziolka, D., Villemagne, V.L., Wechsler, L., Goldstein, S., Thulborn, K.R., Gebel, J., Elder, E.M., DeCesare, S., and Jacobs, A. (2001). Serial [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography after human neuronal implantation for stroke. *Neurosurgery* 49, 586-591; discussion 591-582.

Meng, X., Arocena, M., Penninger, J., Gage, F.H., Zhao, M., and Song, B. (2011). PI3K mediated electrotaxis of embryonic and adult neural progenitor cells in the presence of growth factors. *Exp Neurol* 227, 210-217.

Merkle, F.T., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol* 18, 704-709.

Messier, B., Leblond, C.P., and Smart, I. (1958). Presence of DNA synthesis and mitosis in the brain of young adult mice. *Exp Cell Res* 14, 224-226.

Miller, F.D., and Gauthier, A.S. (2007). Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 54, 357-369.

Ming, G.L., and Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687-702.

Mithal, D.S., Banisadr, G., and Miller, R.J. (2012). CXCL12 Signaling in the Development of the Nervous System. *J Neuroimmune Pharmacol*.

Modo, M., Rezaie, P., Heuschling, P., Patel, S., Male, D.K., and Hodges, H. (2002a). Transplantation of neural stem cells in a rat model of stroke: assessment of short-term graft survival and acute host immunological response. *Brain Res* 958, 70-82.

Modo, M., Stroemer, R.P., Tang, E., Patel, S., and Hodges, H. (2002b). Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage. *Stroke* 33, 2270-2278.

Moore, M.A., and Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 18, 279-296.

Moriguchi, M., Hissong, B.D., Gadina, M., Yamaoka, K., Tiffany, H.L., Murphy, P.M., Candotti, F., and O'Shea, J.J. (2005). CXCL12 signaling is independent of Jak2 and Jak3. *J Biol Chem* 280, 17408-17414.

Morrow, T., Song, M.R., and Ghosh, A. (2001). Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors. *Development* 128, 3585-3594.

Muñoz, L.M., Lucas, P., Holgado, B.L., Barroso, R., Vega, B., Rodríguez-Frade, J.M., and Mellado, M. (2011). Receptor oligomerization: A pivotal mechanism for regulating chemokine function. *Pharmacology & Therapeutics* 131, 351-358.

Murphy, T.H., and Corbett, D. (2009). Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 10, 861-872.

N

Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R.O., and Parnavelas, J.G. (2002). Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat Neurosci* 5, 218-224.

Nadarajah, B., Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O., and Pearlman, A.L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4, 143-150.

Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635-638.

Nakagawa, T., Sasahara, M., Hayase, Y., Haneda, M., Yasuda, H., Kikkawa, R., Higashiyama, S., and Hazama, F. (1998). Neuronal and glial expression of heparin-binding EGF-like growth factor in central nervous system of prenatal and early-postnatal rat. *Brain Res Dev Brain Res* 108, 263-272.

Namihira, M., Nakashima, K., and Taga, T. (2004). Developmental stage dependent regulation of DNA methylation and chromatin modification in a immature astrocyte specific gene promoter. *FEBS Lett* 572, 184-188.

Narantuya, D., Nagai, A., Sheikh, A.M., Masuda, J., Kobayashi, S., Yamaguchi, S., and Kim, S.U. (2010). Human microglia transplanted in rat focal ischemia brain induce neuroprotection and behavioral improvement. *PLoS One* 5, e11746.

Nedergaard, M., and Hansen, A.J. (1993). Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 13, 568-574.

Neel, B.G. (1993). Structure and function of SH2-domain containing tyrosine

phosphatases. *Semin Cell Biol* 4, 419-432.

Nelson, P.T., Kondziolka, D., Wechsler, L., Goldstein, S., Gebel, J., DeCesare, S., Elder, E.M., Zhang, P.J., Jacobs, A., McGrogan, M., et al. (2002). Clonal human (hNT) neuron grafts for stroke therapy: neuropathology in a patient 27 months after implantation. *Am J Pathol* 160, 1201-1206.

Nicholls, D.G., Johnson-Cadwell, L., Vesce, S., Jekabsons, M., and Yadava, N. (2007). Bioenergetics of mitochondria in cultured neurons and their role in glutamate excitotoxicity. *J Neurosci Res* 85, 3206-3212.

Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O., and Guillemot, F. (2001). Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29, 401-413.

O

Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.M., Clark-Lewis, I., Legler, D.F., et al. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382, 833-835.

Ohira, K., Furuta, T., Hioki, H., Nakamura, K.C., Kuramoto, E., Tanaka, Y., Funatsu, N., Shimizu, K., Oishi, T., Hayashi, M., et al. (2010). Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. *Nat Neurosci* 13, 173-179.

Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., and Nishimune, Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407, 313-319.

Okkenhaug, K., Bilancio, A., Farjot, G., Priddle, H., Sancho, S., Peskett, E., Pearce, W., Meek, S.E., Salpekar, A., Waterfield, M.D., et al. (2002). Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* 297, 1031-1034.

Ourednik, J., Ourednik, V., Lynch, W.P., Schachner, M., and Snyder, E.Y. (2002). Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons. *Nat Biotechnol* 20, 1103-1110.

P

Paredes, M.F., Li, G., Berger, O., Baraban, S.C., and Pleasure, S.J. (2006). Stromal-derived factor-1 (CXCL12) regulates laminar position of Cajal-Retzius cells in normal and dysplastic brains. *J Neurosci* 26, 9404-9412.

Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., et al. (1998). Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93, 385-395.

Park, H., and Cox, D. (2011). Syk Regulates Multiple Signaling Pathways Leading to CX3CL1 Chemotaxis in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 286, 14762-14769.

Pastrana, E., Silva-Vargas, V., and Doetsch, F. (2011). Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 486-498.

Paxinos, G.F., K.B. (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates, Vol 1 (San

Diego Academic Press).

Pei, D., Lorenz, U., Klingmuller, U., Neel, B.G., and Walsh, C.T. (1994). Intramolecular regulation of protein tyrosine phosphatase SH-PTP1: a new function for Src homology 2 domains. *Biochemistry* 33, 15483-15493.

Pekny, M., and Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427-434.

Peng, H., Huang, Y., Rose, J., Erichsen, D., Herek, S., Fujii, N., Tamamura, H., and Zheng, J. (2004). Stromal cell-derived factor 1-mediated CXCR4 signaling in rat and human cortical neural progenitor cells. *J Neurosci Res* 76, 35-50.

Peng, S.B., Peek, V., Zhai, Y., Paul, D.C., Lou, Q., Xia, X., Eessalu, T., Kohn, W., and Tang, S. (2005). Akt activation, but not extracellular signal-regulated kinase activation, is required for SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of epitheloid carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 3, 227-236.

Pinsky, D.J., Naka, Y., Liao, H., Oz, M.C., Wagner, D.D., Mayadas, T.N., Johnson, R.C., Hynes, R.O., Heath, M., Lawson, C.A., et al. (1996). Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J Clin Invest* 97, 493-500.

Pluchino, S., Quattrini, A., Brambilla, E., Gritti, A., Salani, G., Dina, G., Galli, R., Del Carro, U., Amadio, S., Bergami, A., et al. (2003). Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 422, 688-694.

Pluchino, S., Zanotti, L., Rossi, B., Brambilla, E., Ottoboni, L., Salani, G., Martinello, M., Cattalini, A., Bergami, A., Furlan, R., et al. (2005). Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature* 436, 266-271.

Powell, E.M., Mars, W.M., and Levitt, P. (2001). Hepatocyte growth factor/scatter factor is a motogen for interneurons migrating from the ventral to dorsal telencephalon. *Neuron* 30, 79-89.

Price, J.T., Tiganis, T., Agarwal, A., Djakiew, D., and Thompson, E.W. (1999). Epidermal growth factor promotes MDA-MB-231 breast cancer cell migration through a phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C-dependent mechanism. *Cancer Res* 59, 5475-5478.

Q

Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, a., Davis, a.a., and Temple, S. (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28, 69-80.

R

Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C.M., Gerard, N.P., Gerard, C., and Lefkowitz, R.J. (2010). Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 628-632.

- Rakic, P. (2009). Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci* 10, 724-735.
- Rakic, P., and Goldman-Rakic, P.S. (1982). The development and modifiability of the cerebral cortex. Overview. *Neurosci Res Program Bull* 20, 433-438.
- Reynolds, B.A., and Rietze, R.L. (2005). Neural stem cells and neurospheres re-evaluating the relationship. *nature methods* 2, 333-336.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.
- Riccio, O., Potter, G., Walzer, C., Vallet, P., Szabo, G., Vutskits, L., Kiss, J.Z., and Dayer, A.G. (2009). Excess of serotonin affects embryonic interneuron migration through activation of the serotonin receptor 6. *Mol Psychiatry* 14, 280-290.
- Rice, D.S., and Curran, T. (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 24, 1005-1039.
- Richards, L.J., Kilpatrick, T.J., and Bartlett, P.F. (1992). De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8591-8595.
- Rietze, R.L., and Reynolds, B.A. (2006). Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol* 419, 3-23.
- Ringstedt, T., Linnarsson, S., Wagner, J., Lendahl, U., Kokaia, Z., Arenas, E., Ernfors, P., and Ibanez, C.F. (1998). BDNF regulates reelin expression and Cajal-Retzius cell development in the cerebral cortex. *Neuron* 21, 305-315.
- Robin, A.M., Zhang, Z.G., Wang, L., Zhang, R.L., Katakowski, M., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, C., and Chopp, M. (2006). Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 125-134.
- Rodriguez-Frade, J.M., Munoz, L.M., Holgado, B.L., and Mellado, M. (2009). Chemokine receptor dimerization and chemotaxis. *Methods Mol Biol* 571, 179-198.
- Rodriguez-Frade, J.M., Vila-Coro, A.J., de Ana, A.M., Albar, J.P., Martinez, A.C., and Mellado, M. (1999). The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3628-3633.
- Rosano, L., Cianfrocca, R., Masi, S., Spinella, F., Di Castro, V., Biroccio, A., Salvati, E., Nicotra, M.R., Natali, P.G., and Bagnato, A. (2009). Beta-arrestin links endothelin A receptor to beta-catenin signaling to induce ovarian cancer cell invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2806-2811.
- Rossi, D.J., Brady, J.D., and Mohr, C. (2007). Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci* 10, 1377-1386.
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., et al. (1996). Knockout of Glutamate Transporters Reveals a Major Role for Astroglial Transport in Excitotoxicity and Clearance of Glutamate. *Neuron* 16, 675-686.
- Rubio, I., Rennert, K., Wittig, U., and Wetzker, R. (2003). Ras activation in response

to lysophosphatidic acid requires a permissive input from the epidermal growth factor receptor. *Biochem J* 376, 571-576.

Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 9, 26-35.

S

Sanchez-Alcaniz, J.A., Haegel, S., Mueller, W., Pla, R., Mackay, F., Schulz, S., Lopez-Bendito, G., Stumm, R., and Marin, O. (2011). Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. *Neuron* 69, 77-90.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* 307, 1098-1101.

Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Jones, R.G., Oliveira-dos-Santos, A.J., Stanford, W.L., Bolon, B., Wakeham, A., Itie, A., Bouchard, D., Kozieradzki, I., et al. (2000). Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* 287, 1040-1046.

Savitz, S.I., Dinsmore, J., Wu, J., Henderson, G.V., Stieg, P., and Caplan, L.R. (2005). Neurotransplantation of fetal porcine cells in patients with basal ganglia infarcts: a preliminary safety and feasibility study. *Cerebrovasc Dis* 20, 101-107.

Schaar, B.T., and McConnell, S.K. (2005). Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13652-13657.

Schabath, H., Runz, S., Joumaa, S., and Altevogt, P. (2006). CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *J Cell Sci* 119, 314-325.

Schonemeier, B., Kolodziej, A., Schulz, S., Jacobs, S., Hoell, V., and Stumm, R. (2008a). Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain. *J Comp Neurol* 510, 207-220.

Schonemeier, B., Schulz, S., Hoell, V., and Stumm, R. (2008b). Enhanced expression of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 after cerebral ischemia in the rat brain. *J Neuroimmunol* 198, 39-45.

Schroeter, M., Jander, S., and Stoll, G. (2002). Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. *J Neurosci Methods* 117, 43-49.

Shah, B.H., Neithardt, A., Chu, D.B., Shah, F.B., and Catt, K.J. (2006). Role of EGF receptor transactivation in phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of MAP kinase by GPCRs. *J Cell Physiol* 206, 47-57.

Shen, L.H., Li, Y., Chen, J., Zhang, J., Vanguri, P., Borneman, J., and Chopp, M. (2006). Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience* 137, 393-399.

Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.M., Goderie, S.K., Roysam, B., and Temple, S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3, 289-300.

Shetty, A.K., Zaman, V., and Hattiangady, B. (2005). Repair of the injured adult hippocampus through graft-mediated modulation of the plasticity of the dentate gyrus in a rat model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 25, 8391-8401.

Shih, A.Y., Johnson, D.A., Wong, G., Kraft, A.D., Jiang, L., Erb, H., Johnson, J.A., and Murphy, T.H. (2003). Coordinate Regulation of Glutathione Biosynthesis and Release by Nrf2-Expressing Glia Potently Protects Neurons from Oxidative Stress. *The Journal of Neuroscience* 23, 3394-3406.

Shin, H.W., Hayashi, M., Christoforidis, S., Lacas-Gervais, S., Hoepfner, S., Wenk, M.R., Modregger, J., Uttenweiler-Joseph, S., Wilm, M., Nystuen, A., et al. (2005). An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J Cell Biol* 170, 607-618.

Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., and Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495-500.

Shuai, K., Horvath, C.M., Huang, L.H., Qureshi, S.A., Cowburn, D., and Darnell, J.E., Jr. (1994). Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76, 821-828.

Shuai, K., Liao, J., and Song, M.M. (1996). Enhancement of antiproliferative activity of gamma interferon by the specific inhibition of tyrosine dephosphorylation of Stat1. *Mol Cell Biol* 16, 4932-4941.

Shyu, W.C., Lin, S.Z., Yen, P.S., Su, C.Y., Chen, D.C., Wang, H.J., and Li, H. (2008). Stromal cell-derived factor-1 alpha promotes neuroprotection, angiogenesis, and mobilization/homing of bone marrow-derived cells in stroke rats. *J Pharmacol Exp Ther* 324, 834-849.

Sierro, F., Biben, C., Martinez-Munoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R.M., Li, M., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M., et al. (2007). Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14759-14764.

Silver, I.A., Deas, J., and Erecinska, M. (1997). Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience* 78, 589-601.

Snyder, J.S., Kee, N., and Wojtowicz, J.M. (2001). Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol* 85, 2423-2431.

Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32, 638-647.

Soriano, E., and Del Rio, J.A. (2005). The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron* 46, 389-394.

Soriano, S.F., Serrano, A., Hernanz-Falcon, P., Martin de Ana, A., Monterrubio, M., Martinez, C., Rodriguez-Frade, J.M., and Mellado, M. (2003). Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses. *Eur J Immunol* 33, 1328-1333.

Sotelo, C. (2004). Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar

system. *Prog Neurobiol* 72, 295-339.

Spassky, N., Merkle, F.T., Flames, N., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2005). Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25, 10-18.

Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J., Rayner, J.R., Jenkins, B.J., Gonda, T.J., Alexander, W.S., Metcalf, D., Nicola, N.A., et al. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-921.

Stein, J.V., Soriano, S.F., M'Rini, C., Nombela-Arrieta, C., de Buitrago, G.G., Rodriguez-Frade, J.M., Mellado, M., Girard, J.P., and Martinez, A.C. (2003). CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. *Blood* 101, 38-44.

Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B., et al. (1995). Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269, 690-693.

Stumm, R., Kolodziej, A., Schulz, S., Kohtz, J.D., and Holtt, V. (2007). Patterns of SDF-1alpha and SDF-1gamma mRNAs, migration pathways, and phenotypes of CXCR4-expressing neurons in the developing rat telencephalon. *J Comp Neurol* 502, 382-399.

Stumm, R.K., Rummel, J., Junker, V., Culmsee, C., Pfeiffer, M., Krieglstein, J., Holtt, V., and Schulz, S. (2002). A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *J Neurosci* 22, 5865-5878.

Stumm, R.K., Zhou, C., Ara, T., Lazarini, F., Dubois-Dalcq, M., Nagasawa, T., Holtt, V., and Schulz, S. (2003). CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci* 23, 5123-5130.

Sugawara, K.-i., Kurihara, H., Negishi, M., Saito, N., Nakazato, Y., Sasaki, T., and Takeuchi, T. (2002). Nestin as a Marker for Proliferative Endothelium in Gliomas. *Lab Invest* 82, 345-351.

Suire, S., Condcliffe, A.M., Ferguson, G.J., Ellson, C.D., Guillou, H., Davidson, K., Welch, H., Coadwell, J., Turner, M., Chilvers, E.R., et al. (2006). Gbetagammagmas and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI(3)Kgamma signalling in neutrophils. *Nat Cell Biol* 8, 1303-1309.

T

Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., et al. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594.

Takiguchi-Hayashi, K., Sekiguchi, M., Ashigaki, S., Takamatsu, M., Hasegawa, H., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Nakanishi, S., and Tanabe, Y. (2004). Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. *J Neurosci* 24, 2286-2295.

Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa,

M., Fujita, N., Nakao, M., and Taga, T. (2001). DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* 1, 749-758.

Tang, X., and Downes, C.P. (1997). Purification and characterization of Gbetagamma-responsive phosphoinositide 3-kinases from pig platelet cytosol. *J Biol Chem* 272, 14193-14199.

Tashiro, K., Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T., and Honjo, T. (1993). Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261, 600-603.

Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J.M., and Doetsch, F. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 279-288.

Tham, T.N., Lazarini, F., Franceschini, I.A., Lachapelle, F., Amara, A., and Dubois-Dalcq, M. (2001). Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stromal cell-derived factor 1 in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* 13, 845-856.

Thored, P., Arvidsson, A., Cacci, E., Ahlenius, H., Kallur, T., Darsalia, V., Ekdahl, C.T., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2006). Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 24, 739-747.

Thored, P., Wood, J., Arvidsson, A., Cammenga, J., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2007). Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 38, 3032-3039.

Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R.C., et al. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269, 230-234.

Tissir, F., Wang, C.E., and Goffinet, A.M. (2004). Expression of the chemokine receptor Cxcr4 mRNA during mouse brain development. *Brain Res Dev Brain Res* 149, 63-71.

Tiveron, M.C., and Cremer, H. (2008). CXCL12/CXCR4 signalling in neuronal cell migration. *Curr Opin Neurobiol* 18, 237-244.

Tiveron, M.C., Rossel, M., Moepps, B., Zhang, Y.L., Seidenfaden, R., Favor, J., Konig, N., and Cremer, H. (2006). Molecular interaction between projection neuron precursors and invading interneurons via stromal-derived factor 1 (CXCL12)/CXCR4 signaling in the cortical subventricular zone/intermediate zone. *J Neurosci* 26, 13273-13278.

Torres, R., and Ramirez, J.C. (2009). A chemokine targets the nucleus: Cxcl12-gamma isoform localizes to the nucleolus in adult mouse heart. *PLoS One* 4, e7570-e7570.

Tran, P.B., Ren, D., Veldhouse, T.J., and Miller, R.J. (2004). Chemokine receptors are expressed widely by embryonic and adult neural progenitor cells. *J Neurosci Res* 76, 20-34.

Tsai, J.W., Bremner, K.H., and Vallee, R.B. (2007). Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nat Neurosci* 10, 970-979.

Tsai, L.H., and Gleeson, J.G. (2005). Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron* 46, 383-388.

V

Vadas, O., Burke, J.E., Zhang, X., Berndt, A., and Williams, R.L. (2011). Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Sci Signal* 4, re2.

Valiente, M., and Marin, O. (2010). Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 20, 68-78.

Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., and Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 329-341.

Vega, B., Munoz, L.M., Holgado, B.L., Lucas, P., Rodriguez-Frade, J.M., Calle, A., Rodriguez-Fernandez, J.L., Lechuga, L.M., Rodriguez, J.F., Gutierrez-Gallego, R., et al. (2011). Technical advance: Surface plasmon resonance-based analysis of CXCL12 binding using immobilized lentiviral particles. *J Leukoc Biol* 90, 399-408.

Veizovic, T., Beech, J.S., Stroemer, R.P., Watson, W.P., and Hodges, H. (2001). Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells. *Stroke* 32, 1012-1019.

Vicario-Abejon, C., Yusta-Boyo, M.J., Fernandez-Moreno, C., and de Pablo, F. (2003). Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *J Neurosci* 23, 895-906.

Vila-Coro, A.J., Rodriguez-Frade, J.M., Martin De Ana, A., Moreno-Ortiz, M.C., Martinez, A.C., and Mellado, M. (1999). The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J* 13, 1699-1710.

W

Wang, X., Mychajlowycz, M., Lau, C., Gutierrez, C., Scott, J.A., and Chow, C.-W. (2012). Spleen Tyrosine Kinase Mediates BEAS-2B Cell Migration and Proliferation and Human Rhinovirus-Induced Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-8. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 340, 277-285.

Wang, Y., Li, G., Stanco, A., Long, J.E., Crawford, D., Potter, G.B., Pleasure, S.J., Behrens, T., and Rubenstein, J.L. (2011). CXCR4 and CXCR7 have distinct functions in regulating interneuron migration. *Neuron* 69, 61-76.

Watling, D., Guschin, D., Muller, M., Silvennoinen, O., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Rogers, N.C., Schindler, C., Stark, G.R., Ihle, J.N., et al. (1993). Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature* 366, 166-170.

Wheeler, S.E., Morariu, E.M., Bednash, J.S., Otte, C.G., Seethala, R.R., Chiosea, S.I., and Grandis, J.R. (2012). Lyn Kinase Mediates Cell Motility and Tumor Growth in EGFRvIII-Expressing Head and Neck Cancer. *Clinical Cancer Research*.

Whitman, M.C., Fan, W., Relat, L., Rodriguez-Gil, D.J., and Greer, C.A. (2009). Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *J Comp Neurol* 516, 94-104.

Wong, M., and Fish, E.N. (1998). RANTES and MIP-1alpha activate stats in T cells. *J Biol Chem* 273, 309-314.

Wong, M., Uddin, S., Majchrzak, B., Huynh, T., Proudfoot, A.E., Plataniias, L.C., and Fish, E.N. (2001). Rantes activates Jak2 and Jak3 to regulate engagement of multiple signaling pathways in T cells. *J Biol Chem* 276, 11427-11431.

Wong, M.M., and Fish, E.N. (2003). Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol* 15, 5-14.

Wright, N., Hidalgo, A., Rodriguez-Frade, J.M., Soriano, S.F., Mellado, M., Pardo-Cabanas, M., Briskin, M.J., and Teixido, J. (2002). The chemokine stromal cell-derived factor-1 alpha modulates alpha 4 beta 7 integrin-mediated lymphocyte adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and fibronectin. *J Immunol* 168, 5268-5277.

Wu, W., Wong, K., Chen, J., Jiang, Z., Dupuis, S., Wu, J.Y., and Rao, Y. (1999). Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400, 331-336.

Wu, Y., Peng, H., Cui, M., Whitney, N.P., Huang, Y., and Zheng, J.C. (2009). CXCL12 increases human neural progenitor cell proliferation through Akt-1/FOXO3a signaling pathway. *J Neurochem* 109, 1157-1167.

X

Xiao, K., Sun, J., Kim, J., Rajagopal, S., Zhai, B., Villen, J., Haas, W., Kovacs, J.J., Shukla, A.K., Hara, M.R., et al. (2010). Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR). *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15299-15304.

Xie, H., Pallero, M.A., Gupta, K., Chang, P., Ware, M.F., Witke, W., Kwiatkowski, D.J., Lauffenburger, D.A., Murphy-Ullrich, J.E., and Wells, A. (1998). EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLCgamma signaling pathway. *J Cell Sci* 111 (Pt 5), 615-624.

Xu, X., Sun, Y.L., and Hoey, T. (1996). Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 273, 794-797.

Y

Yamashita, T., Ninomiya, M., Hernandez Acosta, P., Garcia-Verdugo, J.M., Sunabori, T., Sakaguchi, M., Adachi, K., Kojima, T., Hirota, Y., Kawase, T., et al. (2006). Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26, 6627-6636.

Yoshimura, A. (2005). Negative regulation of cytokine signaling. *Clin Rev Allergy Immunol* 28, 205-220.

Yuan, S.Y., Shen, Q., Rigor, R.R., and Wu, M.H. (2012). Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvascular Research* 83, 82-88.

Z

Zador, Z., Stiver, S., Wang, V., and Manley, G.T. (2009). Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol*, 159-170.

Zhang, J.G., Farley, A., Nicholson, S.E., Willson, T.A., Zugaro, L.M., Simpson, R.J., Moritz, R.L., Cary, D., Richardson, R., Hausmann, G., et al. (1999). The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2071-2076.

Zhang, Q., Liu, G., Wu, Y., Sha, H., Zhang, P., and Jia, J. (2011). BDNF promotes EGF-induced proliferation and migration of human fetal neural stem/progenitor cells via the PI3K/Akt pathway. *Molecules* 16, 10146-10156.

Zhang, R.L., Chopp, M., Chen, H., and Garcia, J.H. (1994). Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 125, 3-10.

Zhang, R.L., Chopp, M., Gregg, S.R., Toh, Y., Roberts, C., Letourneau, Y., Buller, B., Jia, L., S, P.N.D., and Zhang, Z.G. (2009). Patterns and dynamics of subventricular zone neuroblast migration in the ischemic striatum of the adult mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 1240-1250.

Zhang, Z., Chopp, M., Goussev, A., and Powers, C. (1998). Cerebral vessels express interleukin 1 β after focal cerebral ischemia. *Brain Research* 784, 210-217.

Zhao, X., and Guan, J.-L. (2011). Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63, 610-615.

Zhu, L., Gibson, P., Currle, D.S., Tong, Y., Richardson, R.J., Bayazitov, I.T., Poppleton, H., Zakharenko, S., Ellison, D.W., and Gilbertson, R.J. (2009). Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 457, 603-607.

Zhu, Y., Yu, T., Zhang, X.-C., Nagasawa, T., Wu, J.Y., and Rao, Y. (2002). Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nature neuroscience* 8, 719-720.

Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.

ANEXO I

ANEXO I: MATERIAL AUDIOVISUAL SUPLEMENTARIO

Película 1. Ruta de migración Rostral. El bulbo olfatorio presenta una elevada tasa de recambio neuronal diaria (1 %). Esto se consigue por el mantenimiento de una neurogénesis activa a lo largo de la vida adulta. El nicho de las células progenitoras que forman las interneuronas del bulbo olfatorio se encuentra en las paredes que recubren los ventrículos laterales. Estas células progenitoras, forman los neuroblastos de la ZSV que migran rostralmente en cadenas a lo largo de la pared del ventrículo. En la parte más rostral del ventrículo, las cadenas de células convergen para formar una única cadena de células en migración (ruta de migración rostral) que se dirigen al bulbo olfatorio. A lo largo de la ruta de migración rostral, los astrocitos rodean a los neuroblastos aislandolos del parénquima cerebral (tubos gliales). Una vez en el bulbo olfatorio las interneuronas migran a su capa correspondiente para completar su diferenciación.

Película 2. Migración de NPC sobre superficies de fibronectina en ausencia de CXCL12. Video representativo tras el análisis de los experimentos de videomicroscopía. Cada punto señala una misma célula y la línea muestra el recorrido total realizado por cada célula a lo largo del video.

Película 3. Migración de NPC sobre superficies de fibronectina en presencia de CXCL12. Video representativo tras el análisis de los experimentos de videomicroscopía. Cada punto señala una misma célula y la línea muestra el recorrido total realizado por cada célula a lo largo del video.

Película 4. Células Adherentes. Células en movimiento con morfología adherente mostradas en la secuencia de imágenes de la figura 21.

Película 5. Células Redondeadas. Células en movimiento con morfología redondeada mostradas en la secuencia de imágenes de la figura 21.

ANEXO II

ANEXO II: Glosario de Términos

Astrocitos reactivos: Tras un daño en el SNC, los astrocitos se activan, aumentando su capacidad migratoria y proliferativa. Son el principal componente de la cicatriz glial.

Autorrenovación: Propiedad de las células madre que hace que al dividirse, las dos células hijas tengan las mismas propiedades que la célula de la que se originaron.

Bregma: es el punto donde interseccionan la sutura coronal y la sagital en el cráneo. En este punto se encuentran los huesos frontales y los parietales.

Hemisferio contralateral: hemisferio del lado opuesto a donde se genera la lesión (hemisferio sano).

Hemisferio ipsilateral: hemisferio del mismo lado a donde se genera la lesión (hemisferio lesionado).

Cuadro estereotáxico: Equipo necesario para la sujeción del animal, así como para el establecimiento de las coordenadas tridimensionales durante la intervención quirúrgica.

Estriado (núcleo): Parte subcortical del encéfalo que recibe información de la corteza cerebral.

Estereotáxis: forma de intervención quirúrgica que permite localizar de manera precisa distintas partes en el interior del cerebro, haciendo uso de coordenadas tridimensionales.

Factor motogénico: señal extracelular que activa la maquinaria migratoria de la célula sin proporcionar información direccional (por ejemplo, algunos factores de crecimiento).

Filopodio: proyecciones de membrana citoplasmática delgadas (tubulares) que se extienden desde el frente de avance de células en migración. Contienen haces de filamentos de actina paralelos.

Gliogénesis: Es la generación de células de glía (no neuronales) a partir de células madre neurales multipotentes.

Interneuronas: tipo de neuronas en su mayoría GABAérgicas y de morfología no piramidal, que proyectan axones de manera local, ejerciendo una función inhibitoria sobre las neuronas piramidales de los alrededores.

Lamelipodio: protrusión de membrana extendida a modo de sábana, rica en filamentos de actina entrecruzados que se encuentra en el frente de avance de las células en migración.

Mesencéfalo: Parte media del encéfalo en desarrollo a partir del cual se va a formar el cerebelo.

Multipotencia: Propiedad de algunos tipos de células madre por la que pueden generar células de su misma capa o linaje de origen embrionario.

Neurogénesis: Es la generación de neuronas a partir de células madre neurales multipotentes.

Neuronas de proyección: Son un tipo de neuronas glutamatérgicas, que se caracterizan por presentar morfología piramidal con un axón largo con dianas distantes. Se originan en la zona ventricular dorsal de los ventrículos laterales.

Palio: Parte del encéfalo que forma la corteza cerebral.

Plasticidad: término que en neurociencia se refiere a la capacidad de una célula o tejido de sufrir cambios bioquímicos, estructurales o fisiológicos

Reperfusión: Es la recuperación del flujo sanguíneo tras su interrupción temporal.

Romboencéfalo: Parte más posterior del encéfalo en desarrollo a partir del cual se va a formar el bulbo raquídeo.

Sutura sagital: Línea situada en la parte más dorsal del cráneo donde se unen los dos huesos parietales.

Subpalio: Parte del encéfalo situada debajo de la corteza cerebral.

Tálamo: Estructura situada en el centro del cerebro, encima del hipotálamo y debajo de la corteza cerebral.

Telencéfalo: Parte más anterior del prosencéfalo. En el adulto se encuentra sobre el diencefalo. El telencéfalo está constituido por la corteza cerebral, dividida en los dos hemisferios cerebrales, el cuerpo caloso y el estriado.

Ventrículos: Cavidades del SNC interconectadas entre sí, por las que circula el líquido cefalorraquídeo.

Vesículas telencefálicas: Parte más anterior del prosencéfalo, que darán lugar a los dos hemisferios cerebrales en el adulto

Zona Intermedia (ZI): capa de la corteza cerebral presente durante la corticogénesis. Se encuentra a continuación de la zona subventricular (ZSV) y debajo de la placa cortical (PC). Se caracteriza por tener una baja densidad celular y alta densidad de axones procedentes de las neuronas de la placa cortical.

Zona Marginal (ZM): capa más externa de corteza cerebral en desarrollo. Se encuentra debajo de la superficie pial y encima de la placa cortical. Tiene una baja densidad celular.

Zona Subventricular (ZSV): Una de las capas más profundas de la corteza cerebral en desarrollo ocupada por NPC fundamentalmente. Esta capa se mantiene una vez finalizado el desarrollo, aunque de menor espesor, y constituye uno de los nichos neurogénicos en el adulto.

Zona ventricular (ZV): la capa más profunda de la corteza cerebral y rodea los ventrículos. Durante el desarrollo embrionario está compuesta células de la glía radial (células madre neurales). Esta capa se mantiene una vez finalizado el desarrollo, pero el número de células madre se reduce drásticamente, estando compuesta por células endocitales mayoritariamente (células epiteliales).